



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

MICHELE CAMPOS ALVES

Permeação cutânea e vaginal de fármacos: rotas alternativas

**Juiz de Fora
2018**

MICHELE CAMPOS ALVES

Permeação cutânea e vaginal de fármacos: rotas alternativas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutora em saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Nádya Rezende Barbosa Raposo

**Juiz de Fora
2018**

MICHELE CAMPOS ALVES

Permeação cutânea e vaginal de fármacos: rotas alternativas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutora em saúde.

Aprovado em _____

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Geraldo Sérgio Farinazzo Vitral
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Hudson Caetano Polonini
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra
Universidade Federal de Santa Catarina

**Juiz de Fora
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, pela saúde e por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

À minha família por me dar o suporte necessário nesta caminhada e estar sempre ao meu lado.

À professora Nádia pela paciência, orientação, ensinamento e apoio durante esse tempo de convivência. Acima de tudo agradeço pela confiança, pelo incentivo e por não desistir de mim, mesmo após a inserção no mercado de trabalho .

Ao Prof. Marcos Brandão pelo imenso carinho e por sempre me lançar em direção a novos desafios, a me fazer crescer como profissional e como pessoa. Obrigado por me inserir no mundo da pesquisa e muitas vezes por ser um pai bravo, que corrige e ensina a direção certa. Você será sempre o meu “carma”!!!

À Priscila Almeida, que sempre foi dedicada, amiga e companheira. Agradeço por continuar me incentivando mesmo de longe e por iniciar de alguma forma a idéia do projeto que veio a ser o tema da minha tese.

A Hudson Polonini, pela amizade e por contribuir tanto com a minha formação. Obrigada por todas as vezes em que divulgou o seu conhecimento com relação aos conteúdos dos métodos de ensaio e à confecção de artigos.

A toda a equipe Ortofarma, por sempre me receber de braços abertos e por possibilitarem a realização de parte das análises do trabalho.

Aos colegas e amigos do Núcleo de Inovação em Ciências da Saúde com quem tive a imensa satisfação de compartilhar as alegrias e as dificuldades da vida acadêmica durante a graduação, o mestrado e o doutorado.

RESUMO

ALVES, Michele Campos. **Permeação cutânea e vaginal de fármacos: rotas alternativas**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

No capítulo primeiro, objetivou-se inserir a taxifolina (TAX) em uma forma de dosagem semissólida e avaliar a sua permeação *ex vivo* em pele humana. A TAX foi incorporada em uma emulsão de óleo em água. Um método de análise foi desenvolvido e validado utilizando cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) para realizar a quantificação do princípio ativo durante os experimentos e a permeação através da pele humana foi conduzida em células do tipo Franz. No método cromatográfico, foram utilizadas as seguintes condições: coluna octadecilsilano (C18); fase móvel composta por água e acetonitrila (45:55, v/v), acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (pH=2,4); temperatura do compartimento para a coluna de 45 °C; um sistema de fluxo isocrático a 0,5 mL.min⁻¹ e detecção a 288 nm. O método foi preciso (CV<5 %), exato (recuperação entre 98 % e 102 %), linear (R²>0,99), específico e robusto. O experimento de permeação através da pele humana apresentou porcentagem permeada igual a 48,09 % (por dose). Os resultados descritos sugerem que, na matriz estudada, a TAX é capaz de permear até a derme e que, possivelmente, as concentrações alcançadas de TAX possam ser suficientes para que a mesma exerça o seu efeito terapêutico de forma sistêmica. No capítulo segundo, o objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade de utilizar formulações contendo dienogeste (DNG), gestrinona (GTN), nimesulida (NMS) e piroxicam (PRX) para a administração vaginal em pacientes com dor pélvica associada à endometriose (DPAE). Os cremes intravaginais foram compostos individualmente por ingredientes farmacêuticos ativos incorporados em base Pentravan[®] (DNG a 0,2 %, GTN a 0,5 %, NMS a 2,0 % e PRX a 2,0 %). Métodos de quantificação utilizando CLAE foram validados para a quantificação dos princípios ativos, perfis de permeação vaginal foram determinados usando mucosa vaginal porcina em células de difusão do tipo Franz e os parâmetros cinéticos foram determinados. Os métodos foram precisos (CV<5 %), exatos (recuperação entre 98 % e 102 %), lineares (R²>0,99) e específicos. Os experimentos de difusão demonstraram fluxos de 15,98 µg.cm⁻².h⁻¹ para DNG, 3,91 µg.cm⁻².h⁻¹ para PRX, 3,72 µg.cm⁻².h⁻¹ para GTN e 2,26 µg.cm⁻².h⁻¹ para NMS. Os fluxos necessários para liberar a dose diária recomendada para o tratamento da DPAE foram calculados e estabelecidos como 0,87 µg.cm⁻².h⁻¹ para DNG, 0,69 µg.cm⁻².h⁻¹ para GTN, 70,45 µg.cm⁻².h⁻¹ para NMS e 9,64 µg.cm⁻².h⁻¹ para PRX. DNG e GTN apresentaram fluxos de permeação e quantidades absorvidas hipoteticamente compatíveis com o efeito terapêutico *in vivo*, enquanto os estudos com NMS e PRX mostraram uma grande quantidade desses fármacos retida na mucosa vaginal, o que poderia explicar um efeito local para essas duas substâncias. Os resultados sugerem que a matriz avaliada parece ser um veículo intravaginal viável para o uso terapêutico sistêmico de DNG e GTN. Entretanto, NMS e PRX demonstraram a possibilidade de uso para um efeito no tecido local. Estudos adicionais devem ser realizados na formulação para que haja o uso terapêutico sistêmico de NMS e PRX.

Palavras-chave: Controle de Qualidade. Cromatografia em Fase Líquida. Validação. Permeação Cutânea. Absorção vaginal.

ABSTRACT

In Chapter 1, the objective was to insert taxifoline (TAX) into a semi-solid dosage form and to evaluate its *ex vivo* permeation in human skin. TAX was incorporated into an oil-in-water emulsion. Analysis Method was developed and validated using high performance liquid chromatography (HPLC) to active principle quantification during the experiments and permeation through the human skin was conducted in Franz-type cells. In the chromatographic method the following conditions were used: octadecylsilane (C18) column; mobile phase consisting of water and acetonitrile (45:55, v/v), acidified with 0.1 % formic acid (pH = 2,4); column compartment temperature to 45 ° C; an isocratic flow system at 0,5 mL.min⁻¹ and detection at 288 nm. The method was precise (CV<5 %), accurate (recovery between 98 % and 102 %), linear (R²>0,99), specific, and robust. Permeation experiment through human skin presented permeated percentage equal to 48,09 % (per dose). The results described suggest that, in the studied matrix, TAX may be able to permeate up to the dermis and that, possibly, TAX achieved concentrations may be sufficient for the same to exert its therapeutic effect systemically. In Chapter 2, the objective of the study was to evaluate the feasibility of using formulations containing dienogest (DNG), gestrinone (GTN), nimesulide (NMS) and piroxicam (PRX) for vaginal administration in patients with pelvic pain associated with endometriosis. Intravaginal creams were individually composed of active pharmaceutical ingredients incorporated into Pentravan[®] base (0,2 % DNG, 0,5 % GTN, 2,0 % NMS and 2,0 % PRX). Methods of quantification using HPLC were validated for the quantification of active principles, vaginal permeation profiles were determined using porcine vaginal mucosa in Franz type diffusion cells and kinetic parameters were determined. Methods were precise (CV <5 %), exact (recovery between 98 % and 102 %), linear (R²> 0,99) and specific. Diffusion experiments demonstrated fluxes of 15,98 µg.cm⁻².h⁻¹ for DNG, 3,91 µg.cm⁻².h⁻¹ for PRX, 3,72 µg.cm⁻².h⁻¹ for GTN and 2,26 µg.cm⁻².h⁻¹ for NMS. Fluxes required to release the recommended daily dose for the treatment of pelvic pain associated with endometriosis were calculated and established as 0,87 µg.cm⁻².h⁻¹ for DNG, 0,69 µg.cm⁻².h⁻¹ for GTN, 70,45 µg.cm⁻².h⁻¹ for NMS and 9,64 µg.cm⁻².h⁻¹ for PRX. DNG and GTN had permeation fluxes and quantities of drug absorbed hypothetically compatible with therapeutic effect *in vivo*, whereas NMS and PRX studies showed a great amount of these drugs retained in the vaginal mucosa which could explain a local effect for these two substances. The results suggest that the matrix evaluated appears to be a viable intravaginal vehicle for the systemic therapeutic use of DNG and GTN. However, NMS and PRX demonstrated the possibility of use for an effect on the local tissue. Further studies should be performed in the formulation for systemic therapeutic use of NMS and PRX.

Keywords: Quality Control. Chromatography, Liquid. Validation. Cutaneous Permeation. Vaginal Absorption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 –	Estrutura química da taxifolina	16
Figura 2 –	As camadas da pele e suas vias de penetração.....	21
Figura 3 –	Célula de difusão de Franz.....	30
Figura 4 –	Curva de permeação, quantidade de fármaco <i>versus</i> o tempo.....	34
Figura 5 –	Limpeza da pele humana.....	44
Figura 6 –	Montagem da parte superior da célula de Franz.....	46
Figura 7 –	Cromatogramas resultantes das condições selecionadas para o método de análise	50
Gráfico 1 –	Balanço de massas resultante do estudo de permeação <i>ex vivo</i> de TAX.....	55

CAPÍTULO 2

Figura 1 –	Teoria da menstruação retrógrada: refluxo do tecido endometrial através das trompas de falópio durante a menstruação.....	76
Figura 2 –	Estrutura química de dienogeste.....	80
Figura 3 –	Estrutura química de gestrinona.....	81
Figura 4 –	Estrutura química de nimesulida.....	82
Figura 5 –	Estrutura química de piroxicam.....	83
Figura 6 –	Sistema reprodutor feminino.....	84
Figura 7 –	Mucosa vaginal humana.....	85
Figura 8 –	Mucosa vaginal utilizada nos ensaios de permeação.....	95
Figura 9 –	Perfis médios de permeação (n = 6) de DNG, GTN, NMS e PRX em veículo Pentravan [®] , investigados em mucosa vaginal suína.....	104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição dos meios biorelevantes utilizados para os testes de permeação de TAX.....	43
Tabela 2 – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições de análise do creme de TAX.....	49
Tabela 3 – Fatores do planejamento experimental conduzido para o estudo da robustez e seus respectivos efeitos e erros-padrão calculados para o teor de TAX.....	51
Tabela 4 – Resultados obtidos para a linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.....	52
Tabela 5 – Resultados da solubilidade máxima de TAX nos meios receptores testados.....	53
Tabela 6 – Balanço de massas do estudo de permeação <i>ex vivo</i> de TAX em pele humana.....	55

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Condições cromatográficas utilizadas nos métodos analíticos.....	93
Tabela 2 – Resultados obtidos para a linearidade, LD e LQ.....	99
Tabela 3 – Resultados obtidos para a especificidade, precisão e exatidão.....	100
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos da permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX na base Pentravan®.....	103
Tabela 5 – Comparação entre o fluxo obtido experimentalmente e o fluxo alvo calculado.....	105
Tabela 6 – Balanço de massas do ensaio de permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX na base Pentravan®.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	Grau celsius
Cd	Coeficiente de difusão
C ₀	Concentração de fármaco contida na formulação
CYP	Enzimas do citocromo P450
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase do tipo 1
COX-2	Ciclo-oxigenase do tipo 2
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
C18	Octadecilsilano
DAD	Detector de arranjo de fotodiodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNG	Dienogeste/ Dienogest
DPAE	Dor pélvica associada à endometriose
D	Derme
Da	Dalton
EC	Estrato córneo
EV	Epiderme viável
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama(s)
GTN	Gestrinona/ Gestrinone
h	Espessura do caminho de difusão na pele
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	High performance liquid chromatography
HPV	Vírus do papiloma humano
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<i>J</i>	Fluxo em estado estacionário
K _p	Coeficiente de permeabilidade
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
M	Molar
min	Minuto(s)
mg	Miligrama(s)
m/m	Massa/massa
MΩcm	Megaohms.cm
NMS	Nimesulida/ Nimesulide
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
P	Coeficiente de partição
PRX	Piroxicam
SR	Solução receptora
TAX	Taxifolina/ Taxifolin
T _L	Tempo de latência
TR	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
µg	Micrograma(s)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Taxifolina	16
2.1.1	Propriedades físicoquímicas e farmacológicas.....	17
2.2	A pele como via de administração para os fármacos	20
2.2.1	A estrutura da pele.....	20
2.2.1.1	A epiderme.....	22
2.2.1.2	A derme.....	23
2.2.1.3	Tecido subcutâneo.....	23
2.2.2	A absorção de fármacos na pele.....	24
2.2.2.1	Vias de penetração do fármaco na pele.....	24
2.2.3	Formulações de aplicação tópica.....	25
2.2.4	Fatores que afetam a permeabilidade transdérmica.....	27
2.2.4.1	Propriedades físicoquímicas do fármaco.....	27
2.2.4.2	Características relacionadas à formulação.....	27
2.2.4.3	Condições fisiopatológicas da pele.....	28
2.3	Avaliação da qualidade de produtos transdérmicos na forma de dosagem semissólida	29
2.3.1	Célula de difusão de Franz.....	30
2.3.2	Parâmetros a serem avaliados nos ensaios.....	31
2.3.3	Considerações matemáticas para avaliar a absorção cutânea.....	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Reagentes e padrão analítico	36
4.2	Manipulação da forma farmacêutica	36
4.3	Desenvolvimento do método analítico	37
4.3.1	Preparo das soluções padrão e amostra.....	37

4.3.2	Condições cromatográficas	38
4.4	Validação do método analítico	39
4.4.1	Robustez	39
4.4.2	Especificidade	40
4.4.3	Linearidade	41
4.4.4	LD e LQ	41
4.4.5	Precisão	42
4.4.6	Exatidão	42
4.5	Seleção do meio receptor para o ensaio de permeação	42
4.6	Preparo da pele humana	43
4.7	Estudo de permeação cutânea de TAX	45
4.7.1	Retenção de TAX na pele	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Desenvolvimento do método analítico	48
5.2	Validação do método analítico	50
5.3	Seleção do meio receptor para o ensaio de permeação	53
5.4	Estudo de permeação cutânea de TAX	54
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO A	69
	ANEXO B	70

CAPÍTULO 2

1	INTRODUÇÃO	73
2	REVISÃO DA LITERATURA	75
2.1	Endometriose	75
2.1.1	Diagnóstico	78
2.1.2	Tratamento	78
2.1.3	Fármacos selecionados para o estudo	79
2.1.3.1	Dienogeste	79
2.1.3.2	Gestrinona	80
2.1.3.3	Nimesulida	81
2.1.3.4	Piroxicam	82

2.2	A mucosa vaginal como via de administração para fármacos	84
2.2.1	Anatomia, fisiologia e histologia da vagina	84
2.2.2	A absorção de fármacos na mucosa vaginal.....	86
2.2.3	Formulações de aplicação vaginal.....	87
2.2.4	Fatores que afetam a permeabilidade vaginal.....	88
2.3	Avaliação da qualidade de produtos vaginais na forma de dosagem semissólida	89
3	OBJETIVOS	91
3.1	Geral	91
3.2	Específicos	91
4	MATERIAL E MÉTODOS	92
4.1	Reagentes e padrões analíticos	92
4.2	Manipulação das formas farmacêuticas	92
4.3	Métodos analíticos por CLAE/UV	93
4.4	Validação dos métodos analíticos	94
4.5	Estudo da solubilidade de DNG, GTN, NMS e PRX em meio receptor Hank's	94
4.6	Preparo do tecido vaginal	95
4.7	Estudo de permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX	95
4.7.1	Modelização dos perfis de liberação.....	97
4.7.2	Estimativa dos fluxos necessários para obter uma resposta farmacológica.....	97
4.7.3	Retenção de DNG, GTN, NMS e PRX na mucosa.....	98
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1	Validação dos métodos analíticos	99
5.2	Estudo da solubilidade de DNG, GTN, NMS e PRX em meio receptor Hank's	100
5.3	Estudo de permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX	101
6	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108
	ANEXO A	115
	ANEXO B	116
	CONCLUSÃO GERAL	117

CAPÍTULO 1

PESQUISA DA AÇÃO TRANSÉRMICA DE TAXIFOLINA EM FORMA FARMACÊUTICA CREME

1 INTRODUÇÃO

A taxifolina (TAX), também conhecida como di-hidroquercetina, é um flavonóide pertencente à família das flavanonas (MA et al., 2012). Diversas propriedades biológicas são investigadas para este princípio ativo. A sua estrutura química confere à mesma propriedade antioxidante (WEIDMANN, 2012). Evidências científicas também associam a TAX com as atividades anti-inflamatória, anticarcinogênica e cardioprotetora (GE et al., 2018; ARUTYUNYAN et al., 2013; ZHANG et al., 2013; WEIDMANN, 2012; CHOI et al., 2011;).

A TAX possui diversas propriedades farmacológicas em potencial, podendo ser utilizada com fins medicinais. Entretanto, apresenta baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, uma taxa de dissolução lenta a partir de formas farmacêuticas de uso oral na forma sólida. Isso limita a sua biodisponibilidade e a sua aplicação terapêutica (ZU et al., 2014b; ZINCHENKO et al., 2011). Dessa forma, a inserção de TAX em um sistema transdérmico poderia beneficiar o paciente através de um mecanismo de liberação alternativo.

A via transdérmica possui potencial para a liberação sistêmica devido à presença de uma grande área de superfície e à permeabilidade a uma ampla gama de compostos. Esta via oferece algumas vantagens em relação à via oral. A mesma proporciona melhor adesão do paciente devido à facilidade de autoadministração e à conveniência de se utilizar dosagens menos frequentes. Além disso, os sistemas transdérmicos aumentam o valor terapêutico de muitos medicamentos, evitando alguns problemas associados aos mesmos como, por exemplo, irritação do trato gastrointestinal, baixa absorção, interação com alimentos, bebidas e outros fármacos coadministrados e a decomposição devido ao efeito de primeira passagem hepático (GUNJKAR et al., 2015; RAZA et al., 2015). Além disso, existe a possibilidade de interrupção do tratamento de forma imediata pela simples retirada do sistema da pele, caso o paciente inicie a manifestação de efeitos adversos ou tóxicos (JASSIM; SULAIMAN; JABIR, 2018; TANWAR; SACHDEVA, 2016; FOX et al., 2011).

Nesse contexto, a incorporação de TAX em um veículo como uma emulsão para uso transdérmico poderia ser uma solução interessante. Durante o desenvolvimento da forma farmacêutica, é necessário realizar a avaliação da

qualidade da mesma. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de quantificação previamente validado para as análises laboratoriais. Além disso, a formulação deve passar por testes que assegurem a liberação do fármaco no tempo esperado. Nesse sentido, o estudo de permeação transdérmica pode ser utilizado para determinar a capacidade que o sistema transdérmico tem de permitir a difusão do princípio ativo pela pele (POLONINI, 2014; BAERT et al., 2010).

Com o intuito de solucionar alguns dos problemas apresentados, o presente trabalho propõe inserir a TAX em uma emulsão previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa. Um método de análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV) foi desenvolvido e validado para realizar a quantificação do princípio ativo durante os experimentos. O trabalho ainda propõe como objetivo estudar a permeação cutânea de TAX em pele humana, através de modelo *ex vivo*, e avaliar a possibilidade do seu uso transdérmico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Taxifolina

O flavonóide TAX (3',3',4',5,7-pentahidroxi-flavanona, Figura 1), pertence à família das flavanonas (MA et al., 2012). Seu composto ativo pode ser encontrado em cascas dos gêneros *Pinus* e *Larix*, em sementes do gênero *Silybum* (KOCÁBOVÁ et al., 2016), em cebolas (ASMI et al., 2017) e frutas, especialmente uva, laranja e toranja (ZU et al., 2014a).

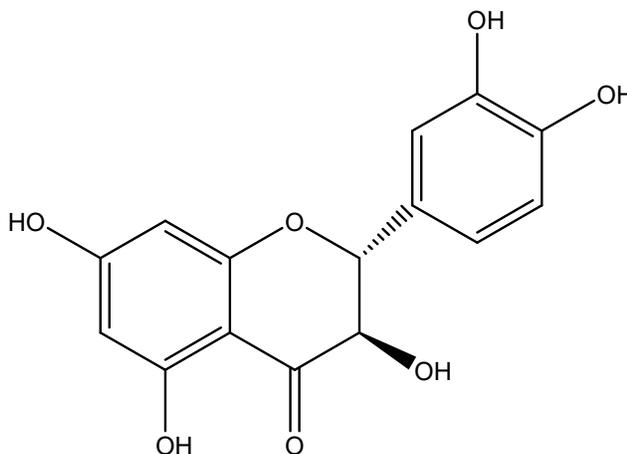


Figura 1. Estrutura química da taxifolina.

A TAX é raramente utilizada na prática clínica como um composto único, sendo encontrada em preparações complexas, como a silimarina (Legalon[®]) e o Pycnogenol[®]. Embora a TAX não seja um componente majoritário nos extratos comerciais, a mesma pode agir em sinergismo com os demais fitocomponentes presentes e contribuir para a sua eficácia terapêutica. A silimarina, por exemplo, é um extrato das sementes de *Silybum marianum*, licenciado na Alemanha para o tratamento da doença hepática crônica (WEIDMANN, 2012) e, mais recentemente, pela Agência Europeia de Medicamentos para a prevenção da hepatite C, recorrente em receptores de transplante de fígado (EMEA, 2018). O Pycnogenol[®] é um extrato obtido a partir da casca do pinheiro marítimo francês (*Pinus pinaster* ou *Pinus*

maritima), sendo o mesmo usado topicamente com a função de antienvelhecimento e, em fórmula oral, para melhorar a saúde cardiovascular, incluindo a função endotelial, a circulação sanguínea, a função plaquetária e a insuficiência venosa (GULATI, 2014).

2.1.1 Propriedades físicoquímicas e farmacológicas

A TAX pode existir nas formas *trans* e *cis*. Seus pontos de fusão variam de 218 a 253 °C, possui massa molar de 304,25 g.mol⁻¹, característica lipofílica intermediária (log P= 0,95) (NCBI, 2017) e um pKa de 7,40, representado pelo grupo hidroxila localizado na posição 7 (JANEIRO; CORDUNEANU; BRETT, 2005). Ambos os isômeros são solúveis em soluções hidroalcoólicas e solventes polares (ROGOZHIN; PERETOLCHIN, 2009).

A estrutura química da TAX confere à mesma propriedade antioxidante (Figura 1). Dessa forma, a TAX elimina o excesso de radicais livres do corpo humano, sendo capaz de melhorar a função imune (GE et al., 2018; ZHANG et al., 2013; WEIDMANN, 2012) e prevenir as doenças cardiovasculares (ARUTYUNYAN et al., 2013). Além disso, a mesma apresenta ação anti-inflamatória (CHOI et al., 2011) e desempenha um papel importante na manutenção das funções fisiológicas do sistema circulatório (SUN et al., 2014; LIANG et al., 2013; LEE et al., 2012; ROGOVSKII et al., 2010).

A TAX é capaz de inibir a melanogênese celular tão eficazmente quanto a arbutina, substância derivada da hidroquinona, um dos agentes despigmentantes mais utilizados em cosméticos (ASMI et al., 2017). Além disso, a TAX pode prevenir a carcinogênese da pele induzida por raios ultravioleta (UV). Embora os seus mecanismos moleculares sejam pouco conhecidos na quimioprevenção, o rastreamento computacional sugere que o receptor do fator de crescimento epidérmico seja alvo potencial da TAX. Os níveis de expressão e atividade promotora da geração de ciclo-oxigenase 2 e prostaglandina E2 induzida por raios UV do tipo B foram atenuados na sua presença. Estudos em modelos de camundongos com carcinogênese de pele induzidas por raios ultravioleta mostraram

que o grupo que recebeu tratamento tópico com TAX suprimiu significativamente a incidência tumoral (OI et al., 2012).

Triagens *in vivo* com experimentos em camundongos demonstraram que a TAX possui efeitos positivos no tratamento de lesões semelhantes à dermatite atópica (KIM et al., 2015) ou em queimaduras, ambas induzidas quimicamente. A TAX é capaz de intensificar os processos de regeneração e reparação de folículos pilosos e glândulas sebáceas após a queimadura (SHUBINA; SHATALIN, 2012).

Outras propriedades biológicas são investigadas para a TAX. Arutyunyan e colaboradores (2013) verificaram que, em experimentos com ratos, doses orais de 30-100 µg/kg/dia de TAX são capazes de diminuir a atividade da enzima conversora de angiotensina, contribuindo assim para reduzir os riscos de aterosclerose e de doenças cardiovasculares. Kuspradini, Mitsunaga e Ohashi (2009) identificaram a TAX como um composto bioativo promissor no desenvolvimento de um agente anticariogênico, devido à sua atividade antimicrobiana contra *Streptococcus sobrinus*, principal micro-organismo responsável pelas cáries dentárias. Mishra, Singh e Misra (2017) verificaram a capacidade da TAX em inibir o crescimento de hifas e, portanto, a virulência da espécie *Candida albicans*.

Embora a TAX apresente diversas propriedades farmacológicas em potencial (YANG et al., 2011), sua baixa solubilidade em água faz com que apresente uma taxa de dissolução lenta a partir de formas farmacêuticas de uso oral na forma sólida. Isso limita a sua biodisponibilidade e aplicação terapêutica (ZU et al., 2014b; ZINCHENKO et al., 2011).

Diferentes técnicas foram relatadas para melhorar a biodisponibilidade oral de TAX. Zu e colaboradores (2014a) projetaram a preparação de uma nanoemulsão. Em seguida, houve a complexação com γ -ciclodextrinas e um processo de liofilização, obtendo-se partículas com tamanho de 167,2 nm. Testes de dissolução demonstraram que as nanopartículas exibiram maior taxa de dissolução (3 vezes) e solubilidade (1,72 vezes) em relação a TAX bruta. Além disso, o aumento da sua biodisponibilidade oral foi comprovado em estudos com ratos. O valor da área sob a curva obtido para as nanopartículas foi 7 vezes maior que o valor obtido para a TAX bruta.

Zinchenko e colaboradores (2011) realizaram uma cadeia de sínteses orgânicas para formar um complexo de TAX com β -ciclodextrinas. A TAX modificada possui maior solubilidade em água. Este complexo não é estável em meio aquoso,

se dissociando e deixando a TAX livre para interagir com a bicamada lipídica. Ensaio em ratos foram realizados através da introdução oral de TAX e TAX modificada. Análises cromatográficas dos componentes foram realizadas no plasma sanguíneo 7,5 h após a introdução dos mesmos e a TAX estava presente apenas nos ratos que receberam a ingestão do complexo.

Shikov e colaboradores (2009) prepararam uma nanodispersão sólida de TAX em polivinilpirrolidona. A cinética de liberação do fármaco a partir da nanodispersão foi superior ao fármaco puro e propiciou a liberação de 90 % de princípio ativo após 30 min.

A nanotecnologia vem proporcionando resultados significativos em literatura para melhorar a biodisponibilidade oral de TAX. Entretanto, outras vias de administração poderiam ser avaliadas como forma alternativa para a ação sistêmica da mesma.

Dessa forma, a TAX tornou-se alvo de pesquisas em nosso grupo. Inicialmente, a mesma foi avaliada por um trabalho de mestrado (ALMEIDA, 2015). Neste, a TAX foi inserida em uma emulsão e experimentos de permeação *ex vivo* foram realizados em mucosa vaginal suína. A porcentagem permeada por dose foi de 87,43 %, sugerindo seu alto potencial em exercer efeitos sistêmicos. O intuito do estudo da TAX por esta via foi o desenvolvimento de uma nova alternativa ao tratamento da endometriose. Partindo do pressuposto que a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese da endometriose, a TAX apresentou-se como uma molécula alvo para o desenvolvimento de um novo medicamento que atue de forma adjuvante e complementar ao arsenal terapêutico já existente. Isso foi avaliado devido ao fato deste flavonóide exercer atividades antioxidante e anti-inflamatória (ALVES et al., 2018).

A via transdérmica apresenta-se como um recurso para a administração de fármacos com baixa biodisponibilidade oral (GUNJKAR et al., 2015; RAZA et al., 2015) como a TAX. Dessa forma, a inserção da mesma em um sistema transdérmico poderia beneficiar o paciente através de um mecanismo de liberação alternativo. O relato em literatura sobre o seu uso transdérmico, a partir do uso de uma emulsão tradicional, ainda não foi identificado, o que evidencia o caráter inédito desta pesquisa.

2.2 A pele como via de administração para os fármacos

2.2.1 A estrutura da pele

A pele é considerada o órgão mais extenso do corpo humano. Em adultos, pode representar uma superfície externa de 2 metros quadrados e apresentar variações com relação à cor, espessura e presença de unhas, pelos e glândulas, conforme a região considerada. É responsável por mais de 10 % da massa corporal e recebe cerca de um terço de todo o sangue que circula pelo corpo humano (JAWALE et al., 2017).

É o principal órgão de comunicação com o meio externo e representa uma camada protetora de tecidos subjacentes como músculos, ligamentos e órgãos internos. Dessa forma, é considerada uma barreira contra ataques físicos, químicos e microbiológicos. Além disso, desempenha um papel importante na manutenção da temperatura corporal, impede a perda da água, serve como um órgão excretor através das glândulas sebáceas e sudoríparas e possui terminações nervosas que lhes conferem funções sensoriais (pressão, dor, tato, calor e frio). É composta por três camadas que se diferem com relação à sua estrutura e composição. Estas são representadas por: epiderme, derme e tecido subcutâneo (hipoderme) (Figura 2 A) (TANWAR; SACHDEVA, 2016).

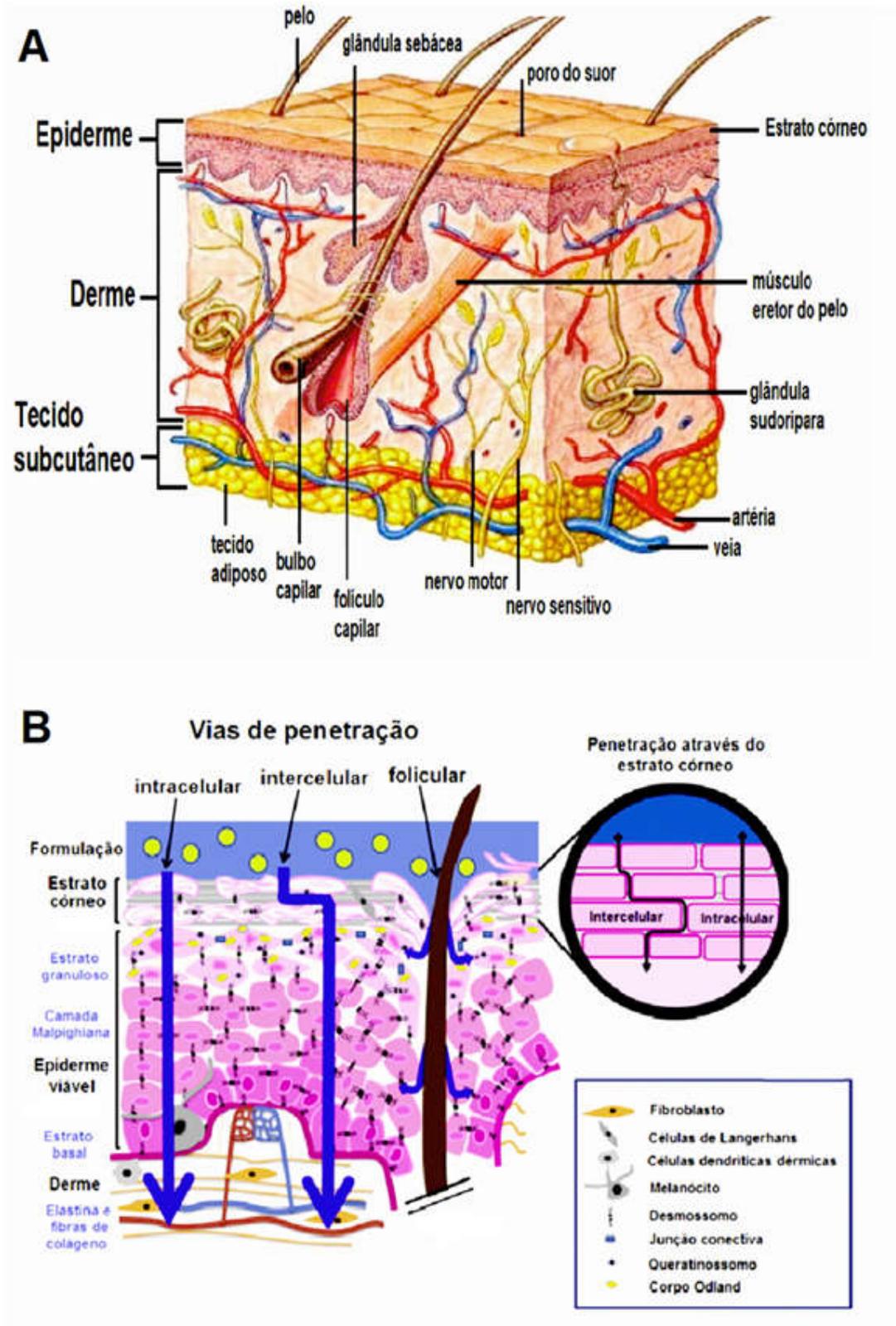


Figura 2. As camadas da pele e suas vias de penetração. A: epiderme, derme e tecido subcutâneo; B: penetração intracelular, intercelular e folicular. Adaptado de: BAVASKAR et al., 2015; BOLZINGER et al., 2012.

2.2.1.1 A epiderme

A epiderme é um epitélio escamoso estratificado, continuamente auto-renovável, que cobre toda a superfície externa do corpo e pode ser dividida em duas partes distintas: a epiderme viável (camada hidrofílica contendo 70 % de água) e o estrato córneo (camada hidrofóbica contendo 13 % de água) (Figura 2 B). A epiderme viável é formada pelo estrato basal, pela camada Malpighiana e pelo estrato granuloso (BOLZINGER et al., 2012).

A camada basal é formada por células jovens colunares, em multiplicação constante, sendo responsáveis pela renovação celular da epiderme. Como as células produzidas por esta camada movem-se para fora, alteram-se morfológica e histoquimicamente até chegarem à superfície (TANWAR; SACHDEVA, 2016). As células da camada Malpighiana são mais poligonais e apresentam projeções citoplasmáticas que ancoram as células umas às outras, dando resistência ao atrito. As células do estrato granuloso possuem em seu citoplasma grânulos de queratohialina que são precursores da queratina do estrato córneo (BEMVINDO, 2006).

O estrato córneo é a camada mais superficial, composta de células mortas, secas e alongadas, chamadas de corneócitos, produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável. Os corneócitos encontram-se inseridos numa matriz lipídica complexa contendo ceramidas, colesterol, sulfato de colesterol e ácidos graxos livres. Esta matriz lipídica está disposta em múltiplas camadas, formando lamelas lipídicas. Para a sua manutenção, a estrutura é renovada continuamente, uma vez que, está constantemente exposta a degradações químicas e físicas causadas pelo ambiente. A tortuosidade de suas células e a sua adesão são obstáculos de difícil transposição e proporcionam a esta camada o principal empecilho para a penetração efetiva de fármacos pela via transdérmica (JASSIM; SULAIMAN; JABIR, 2018).

2.2.1.2 A derme

A derme é a camada intermediária da pele, sendo formada por: tecido conjuntivo, que sustenta a epiderme e elementos fibrilares como o colágeno e a elastina (GUNJKAR et al., 2015). Na derme, ainda estão presentes os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações nervosas, as glândulas sudoríparas, sebáceas e os folículos pilosos. É responsável pela flexibilidade, elasticidade e homeostase da pele (RAMESH; VELRAJ, 2018; BAVASKAR et al., 2015).

Os folículos pilosos são formados pela invaginação da epiderme, local onde se inserem os pelos, que se projetam para a superfície externa do corpo. As glândulas sebáceas possuem ductos que desembocam nos folículos pilosos e secretam lipídeos contendo triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e ésteres de colesterol. Essa secreção protege o corpo de infecções bacterianas e evita a perda de água. As glândulas sudoríparas secretam a parte aquosa do suor através dos ductos sudoríparos que desembocam na superfície da pele. A sua principal função é a regulação térmica do corpo (ANSARI et al., 2018).

2.2.1.3 Tecido subcutâneo

O tecido subcutâneo é a camada mais profunda da pele e é constituído por tecido adiposo denso e conjuntivo (RAMESH; VELRAJ, 2018). Pode ser considerado como um isolante térmico e atua na reserva energética e na proteção contra choques mecânicos (BAVASKAR et al., 2015).

2.2.2 A absorção de fármacos na pele

2.2.2.1 Vias de penetração do fármaco na pele

O processo de absorção dérmica descreve a passagem de compostos pela pele e o processo é dividido em três etapas: (i) penetração, a introdução de uma substância em uma camada particular da pele; (ii) permeação, a passagem de uma camada para a outra; e (iii) absorção no sistema vascular. Os mecanismos de absorção de fármacos na pele são compreendidos pela determinação macroscópica da via de permeação e dos parâmetros físicoquímicos de seu transporte. As principais vias de permeação são: intercelular, intracelular e folicular (Figura 2 B) (BOLZINGER et al., 2012).

A via intracelular é a mais direta, uma vez que o fármaco passa diretamente através das estruturas lipídicas do estrato córneo e do citoplasma dos corneócitos. Essa sequência de particionamento e difusão em estruturas tanto lipofílicas quanto hidrofílicas faz com que as substâncias apresentem resistência significativa ao permear. Este fator faz com que a via não seja considerada muito relevante. A via intercelular é considerada predominante para a maioria dos fármacos. Nesta, o permeante supera o estrato córneo através da matriz extracelular, sem atravessar as células (ANSARI et al., 2018).

Na via folicular, a difusão ocorre através dos folículos capilares e das glândulas sudoríparas e sebáceas. Estes três anexos fazem uma comunicação entre a derme e a superfície corporal, formando descontinuidades no estrato córneo. Desta forma, atuam como potenciais locais de acúmulo de formulações, sendo considerados como vias alternativas para a absorção de fármacos transdérmicos (ANSARI et al., 2018; JHAWAT et al., 2013). Embora estes apêndices representem apenas 0,1 % da superfície total da pele e uma barreira física para compostos que permeiam o estrato córneo com facilidade, podem ser considerados relevantes para a permeabilidade de íons, moléculas altamente polares e compostos de alto peso molecular (BARBERO; FRASCH, 2017).

O estrato córneo é a camada limitante para a permeação. A complexidade de sua estrutura impede que a maior parte das moléculas a atravesse, sendo considerado como a principal barreira para a passagem de substâncias químicas para o interior do organismo (JASSIM; SULAIMAN; JABIR, 2018).

Após a passagem pela epiderme, o fármaco encontra uma rede vascular extensa presente na derme. Esta propicia a absorção e a entrada de moléculas no sistema circulatório para que encontrem o acesso ao seu alvo central (TANWAR; SACHDEVA, 2016).

2.2.3 Formulações de aplicação tópica

Os produtos de aplicação tópica podem ter três diferentes funções. Na primeira função, pode ser desejável que o ativo fique presente apenas na superfície da pele. Essas formulações farmacêuticas podem ser representadas, por exemplo, por produtos para a desinfecção da pele, repelentes de insetos, protetores solares e os cosméticos, que são utilizados apenas com o intuito de fazer o cuidado e a proteção da pele (JHAWAT et al., 2013). Na segunda função, as formulações são projetadas para permitir a penetração de seus ativos em uma das camadas da pele. Os fármacos antifúngicos, por exemplo, possuem sítio de ação no estrato córneo; os fármacos antiacne, como a isotretinoína, agem nas glândulas sebáceas; os estimuladores do crescimento capilar agem nos folículos capilares, e os antiperspirantes agem nas glândulas sudoríparas (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2017). Nesses casos, a absorção na circulação sistêmica não é o desejável, uma vez que a absorção parcial poderia levar a efeitos adversos após o uso extensivo da formulação. Na terceira função, a ação sistêmica do ativo é o objetivo da terapia, sendo as reações locais indesejadas neste caso (JAWALE et al., 2017).

O medicamento cujo princípio ativo se dissocia dos demais componentes da formulação atinge a superfície cutânea, se difunde pelo estrato córneo, chega à derme e é absorvido nos capilares sanguíneos, pode ser considerado como transdérmico (DANIELS, 2017). As formas farmacêuticas transdérmicas podem se apresentar na forma de adesivos, géis, pomadas, loções, cremes, géis-cremes, emplastos, espumas, *sprays* e aerossóis (ENGELHARDT, 2015).

A forma de dosagem convencionalmente utilizada é a via oral. Esta deve ser administrada em doses múltiplas e em quantidade particular para que haja eficácia na terapia. Entretanto, possui limitações no tratamento de pacientes com sintomas de vômito e diarreia e não é considerada adequada em casos de pacientes inconscientes e inoperativos. Além disso, há a necessidade de maior controle no cumprimento da terapia pelo paciente, de forma a evitar a flutuação do nível plasmático do fármaco (BHOWMIK et al., 2013; JHAWAT et al., 2013; SHARMA; SAINI; RANA, 2013).

A via transdérmica apresenta algumas vantagens em relação à via oral. A mesma pode proporcionar a absorção do fármaco a uma velocidade controlada, o que permite manter constantes os níveis plasmáticos dos princípios ativos. Dessa forma, as falhas terapêuticas ou os efeitos adversos frequentemente associados à dosagem intermitente podem ser evitados. A via proporciona melhor adesão do paciente devido à facilidade de autoadministração e à conveniência de se utilizar dosagens menos freqüentes. Além disso, os sistemas transdérmicos aumentam o valor terapêutico de muitos medicamentos, evitando alguns problemas associados aos mesmos como, por exemplo, irritação do trato gastrointestinal, baixa absorção, interação com alimentos, bebidas e outros fármacos coadministrados e decomposição devido ao efeito de primeira passagem hepático (GUNJKAR et al., 2015; RAZA et al., 2015).

Outras vantagens ainda podem ser citadas, como: utilização de substâncias que possuem um tempo de meia-vida muito curto; emprego de fármacos que exibem um baixo índice terapêutico; e interrupção do tratamento de forma imediata pela simples retirada do sistema da pele, caso o paciente inicie a manifestação de efeitos adversos ou tóxicos (JASSIM; SULAIMAN; JABIR, 2018; TANWAR; SACHDEVA, 2016; FOX et al., 2011; GUY, 2010; HATHOUT et al., 2010)

Entretanto, existem algumas limitações com relação a essa via, como: irritação da pele no local da aplicação, causada por algumas substâncias em alta concentração e a impossibilidade de inserção de fármacos que requeiram altas doses (> 10 mg/ dia). Moléculas que possuem peso molecular mais elevado (> 500 Da) e que apresentam coeficiente de partição muito baixo ou alto possuem dificuldade para atingir a circulação sistêmica. Além disso, a barreira da pele muda de um local para outro na mesma pessoa, de pessoa para pessoa e de acordo com a idade (SAHU et al., 2017; GUNJKAR et al., 2015; JHAWAT et al., 2013;).

2.2.4 Fatores que afetam a permeabilidade transdérmica

Os fatores que afetam a permeabilidade transdérmica são classificados em três categorias: propriedades físicoquímicas do fármaco, características relacionadas à formulação e às condições fisiológicas e patológicas da pele (RAMTEKE; DHOLE; PATIL, 2012).

2.2.4.1 Propriedades físicoquímicas do fármaco

A massa molar determina o coeficiente de difusão do fármaco. Moléculas com peso molecular mais elevado (> 500 Da) não conseguem penetrar no estrato córneo, sendo o peso molecular ideal para a administração por essa via ainda discutível em literatura (SAHU et al., 2017).

Enquanto isso, o coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) representa a partição água-estrato córneo. Substâncias hidrofílicas não conseguem penetrar na camada lipídica da pele e substâncias hidrofóbicas penetram facilmente, mas permanecem armazenadas dentro do estrato córneo, uma vez que a próxima camada é hidrofílica (BOLZINGER et al., 2012). Moléculas com lipofilicidade intermediária ($\log P$ entre 1 e 3) são consideradas ótimas para permear através da rota intercelular (BENSON; WATKINSON, 2012).

2.2.4.2 Características relacionadas à formulação

Propriedades relacionadas ao sistema de administração também influenciam no processo de liberação do fármaco. A boa solubilidade deste no veículo é determinante para a sua taxa de liberação. Além disso, existem diversas substâncias conhecidas como promotores químicos que podem ser adicionadas às formulações, de modo a permitir a penetração de compostos em um fluxo conveniente. Esses

promotores causam alterações físicoquímicas ou fisiológicas no estrato córneo (RAMTEKE; DHOLE; PATIL, 2012).

Os promotores químicos podem interagir com a queratina presente nos corneócitos, tornando a sua estrutura mais frouxa e a camada córnea mais permeável ou alterar a solubilidade dos lipídeos, permitindo com que uma segunda molécula passe pelo estrato córneo mais facilmente. Alguns exemplos de agentes promotores de permeação são: fosfolipídeos, pirrolidonas, ácidos graxos e seus ésteres (como o ácido oléico), sulfóxidos e similares (como dimetilsulfóxido) e ciclodextrinas (LAKSHMI et al., 2017; ENGELHARDT, 2015; KUMAR; JAIN; PRAJAPATI, 2011).

A permeabilidade também pode ser influenciada pelo pH da formulação, podendo o mesmo provocar a ionização de ácidos e bases fracas. A ionização não seria desejável, uma vez que os fármacos possuem maior capacidade de permeação quando estão em sua forma não iônica (TANWAR; SACHDEVA, 2016).

2.2.4.3 Condições fisiopatológicas da pele

Alguns fatores relacionados à fisiologia da pele estão diretamente relacionados com a permeabilidade de substâncias na mesma. A hidratação, por exemplo, provoca a dilatação do estrato córneo, aumentando a solubilidade do permeante e o particionamento do veículo para a membrana. O aumento da temperatura da pele promove a fluidização de lipídeos, a vasodilatação e, conseqüentemente o aumento do fluxo sanguíneo local e da absorção através da pele. A idade também é considerada como um fator importante. A pele de jovens e idosos são mais permeáveis do que a pele de pessoas de meia idade, enquanto crianças pré-maturas estão mais suscetíveis a efeitos tóxicos por não possuírem estrato córneo (JAWALE et al., 2017).

A pele difere em características anatômicas como espessura do estrato córneo, número de folículos capilares e número de glândulas sudoríparas por área de superfície unitária. Essa diferença pode existir de local para local e de pessoa para pessoa, alterando a absorção cutânea. Esta também pode ser influenciada por fisiopatologias, bem como a presença de qualquer lesão que provoque a ruptura das

camadas lipídicas do estrato córneo. Além disso, ainda existe a presença de várias enzimas de metabolização que fazem com que fármacos não atinjam a circulação sanguínea na sua forma ativa (JAWALE et al., 2017).

2.3 Avaliação da qualidade de produtos transdérmicos na forma de dosagem semissólida

Durante o desenvolvimento de formas farmacêuticas transdérmicas, é necessário realizar a avaliação da qualidade do produto acabado. Este deve passar por testes que assegurem a uniformidade de doses e a liberação do fármaco no tempo esperado. Dentre os testes específicos requeridos, encontram-se o teste de liberação e o ensaio de permeação cutânea (POLONINI, 2014; BAERT et al., 2010).

O teste de liberação *in vitro* consiste em avaliar a liberação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica, de modo a tornar-se disponível para ser absorvido. Neste, o estudo é conduzido através da passagem de fármacos por membranas sintéticas. No momento em que essa membrana é substituída por um segmento de pele, o estudo *ex vivo* deve ser considerado como um ensaio de permeação cutânea. Este é capaz de avaliar não apenas a liberação do fármaco a partir do dispositivo, como também o potencial de difusão por gradiente de concentração através da pele (ENGELHARDT, 2015).

No ano de 2004, foi lançado um protocolo padrão para essas análises, conhecido como “Guia para o teste de produtos químicos: método *in vitro* para a absorção na pele”. Este foi estabelecido pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), sendo uma etapa importante na aceitação de métodos para a avaliação da liberação e da permeação cutânea (BENSON; WATKINSON, 2012; OECD, 2004).

Em 2009 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº 48, de outubro de 2009. Esta exigiu que a determinação do fluxo cutâneo de fármacos através de estudos de permeação cutânea fosse obrigatória na pesquisa e no desenvolvimento de novos produtos tópicos e transdérmicos (BRASIL, 2009).

Em 2014, a USP determinou que o teste de liberação fosse um requisito farmacopeico. O mesmo deve ser escolhido para avaliar e detectar mudanças *in*

vitro que poderiam eventualmente afetar o desempenho *in vivo*, devido a alterações físicoquímicas da formulação (USP, 2014).

2.3.1 Célula de difusão de Franz

A célula de difusão de Franz é amplamente utilizada para este estudo, sendo considerada como um método simples e de fácil controle das condições experimentais. O sistema é composto de seis células individuais ligadas a um banho termostaticado, que se encontra sob agitação magnética constante. As células (Figura 3) possuem dois compartimentos: o doador, que contém o fármaco; e o receptor, que contém a solução em que o fármaco é solúvel (meio receptor). Estes compartimentos encontram-se separados por uma membrana artificial ou biológica. O produto deve ficar em contato com a membrana, na parte de cima do compartimento doador. A passagem do princípio ativo deve ser monitorada pela quantificação do mesmo nas amostras do meio receptor, sendo estas coletadas em diferentes tempos. O gráfico da quantidade acumulada de fármaco no meio em função do tempo fornece o seu perfil de liberação (FERREIRA, 2015; USP, 2014).

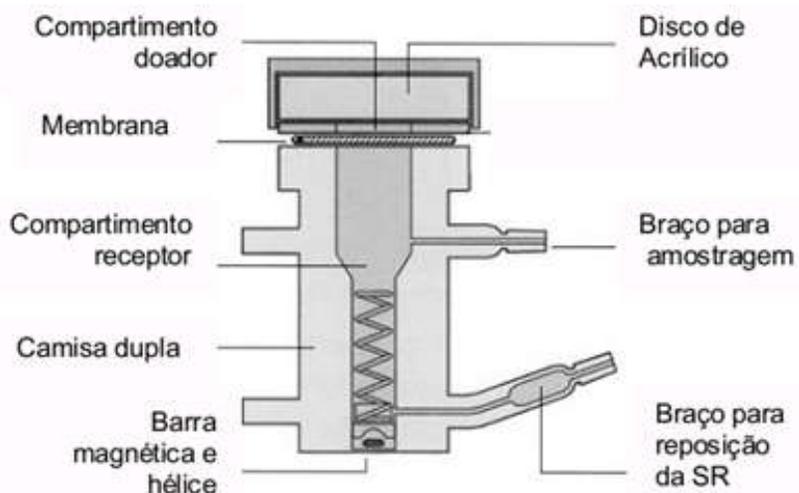


Figura 3. Célula de difusão de Franz. SR: solução receptora.

Fonte: BEMVINDO, 2006.

2.3.2 Parâmetros a serem avaliados nos ensaios

Durante a realização dos ensaios em célula de difusão de Franz, alguns parâmetros devem ser avaliados, como: a escolha da membrana ou espécie animal (ensaios *in vitro* ou *ex vivo*), a temperatura e a composição do meio receptor e o tempo de exposição (OECD, 2004).

Existe uma variedade de membranas sintéticas disponíveis comercialmente que pode ser usada com sucesso durante os experimentos *in vitro*. Alguns materiais encontrados no mercado são constituídos de polímeros de tetrafluoretileno, fluoreto de polivinilideno, policarbonato, polissulfona, polietersulfona, nylon e celulose. Cada um desses tipos de membrana podem apresentar diferentes diâmetros e tamanhos de poros (KLEIN; HECKART; THAKKER, 2018).

O ensaio de permeação *ex vivo* requer o uso de membranas que mimetizem a função de barreira do estrato córneo. A pele humana é o modelo mais apropriado e considerado como padrão ouro para esses experimentos. A sua disponibilidade é, muitas vezes, limitada e a utilização de peles de animais serve como uma alternativa. Peles de rato, suíno, cobra e camundongo são muito utilizadas, sendo que a pele suína é considerada a mais relevante para a substituição, visto que a mesma apresenta propriedades histológicas e bioquímicas semelhantes à pele humana (BARBERO; FRASCH, 2009; ROGGIA, 2009).

A pele humana pode ser obtida a partir de cadáveres ou de cirurgias plásticas. A espessura do estrato córneo e a densidade de folículos podem causar diferenças de permeabilidade entre diferentes regiões anatômicas. Com o intuito de minimizar a variabilidade dos resultados, deve-se padronizar o local de remoção da pele, sendo a pele do abdômen de mulheres frequentemente utilizada para o teste (BETTONI, 2009).

A seleção do meio receptor deve ser definida de acordo com a solubilidade da substância teste, de forma a manter a condição *sink* do sistema, ou seja, o meio receptor deve possuir alta capacidade de dissolver e carrear o fármaco e não deve exceder 10% da concentração de saturação para o fármaco no final do teste. Soluções salinas de pH 7,4 são usualmente escolhidas para compostos hidrossolúveis enquanto soluções contendo solvente orgânico, como etanol ou

polietilenoglicol, podem ser utilizadas para estudos com substâncias lipofílicas. Outra possibilidade seria a adição de albumina sérica bovina (ENGELHARDT, 2015).

O compartimento receptor deve permitir o controle de temperatura e a homogeneização do meio receptor. Para a maioria dos produtos destinados à aplicação na superfície da pele, $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ é a temperatura adequada. A taxa de agitação deve ser constante em todas as células e o valor utilizado para muitos produtos comercialmente disponíveis é de 600 rpm, embora outras velocidades possam ser utilizadas (KLEIN; HECKART; THAKKER, 2018).

O tempo de exposição do produto à pele deve refletir as condições normais de uso. Preferencialmente, o tempo de 24 h não deve ser excedido, com o intuito de não comprometer a viabilidade da membrana. Esta deve ser preservada para que haja a quantificação do fármaco retido no estrato córneo e nas demais camadas (OECD, 2004).

A determinação da penetração do princípio ativo no estrato córneo pode ser realizada pela técnica do *tape stripping*. Esta tem como finalidade a remoção do estrato córneo, através da aplicação de fitas adesivas na pele, com pressão uniforme e remoção abrupta. Os adesivos devem ser aplicados na mesma área e, depois de retirados, devem ser tratados com solução solvente. As substâncias removidas devem ser quantificadas por um método previamente selecionado e validado (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2017).

Os estudos de permeação cutânea podem ser complementados pela técnica de retenção cutânea, onde a presença das substâncias é avaliada na epiderme e na derme. O método clássico para separar essas camadas é imergir a pele em água a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min e “descolar” a epiderme da derme com o auxílio de uma pinça. Porém, existem controvérsias com relação a essa técnica, uma vez que, a alteração na viabilidade da pele após a imersão em água quente já foi comprovada (ENGELHARDT, 2015). Uma possível alternativa à separação pelo calor é seccionar a pele em espessuras definidas antes dos ensaios, empregando um dermatômetro. Uma espessura de $200\text{ }\mu\text{m}$ corresponde ao estrato córneo mais a epiderme. Após as separações, cada camada de pele deve entrar em contato com um solvente previamente selecionado e o princípio ativo presente deve ser quantificado (BEMVINDO, 2006).

2.3.3 Considerações matemáticas para avaliar a absorção cutânea

O modelo de absorção de fármacos pela pele leva em consideração a difusão passiva, impulsionada pelo gradiente de concentração de moléculas penetrantes. Na difusão passiva, a matéria se move de uma região do sistema para outra sem que haja gasto de energia. A taxa de transferência por unidade de área da substância difundida de uma seção é proporcional ao gradiente de concentração. Essa taxa é expressa pela primeira Lei de Fick (Equação 1):

$$J_s = \frac{C_d \cdot C_0 \cdot P}{h} = K_p \cdot C_0 \quad (1)$$

na qual, C_d é o coeficiente de difusão do fármaco na camada, C_0 é a concentração de fármaco contida na formulação que se assume constante, P é o coeficiente de partição do fármaco entre a formulação e a camada córnea, h é a espessura do caminho de difusão na pele e K_p é o coeficiente de permeabilidade no estrato córneo. O fluxo de estado estacionário (J_s) é a taxa de passagem da substância através de uma unidade de superfície de área da pele, em função do tempo. A lei de Fick pode ser expressa das duas formas descritas na equação, uma vez que K_p pode ser obtido pelo produto $C_d \cdot P/h$ (COUTO et al., 2014; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2015).

Além do uso das equações retiradas a partir da primeira lei de Fick, é possível obter, na prática, o fluxo de fármaco permeado pela plotagem de um gráfico, de quantidade de fármaco permeado através da membrana *versus* o tempo, conforme representado na Figura 4. O fluxo do fármaco no estado estacionário pode ser calculado a partir da inclinação da reta obtida por regressão linear. A extrapolação da reta até o eixo X fornece o tempo de latência (T_L) ou *lag time*. Essencialmente, a medida do T_L é a medida do tempo necessário para o gradiente de concentração do fármaco através da membrana tornar-se constante (CHANTASART; HAO; LI, 2013).

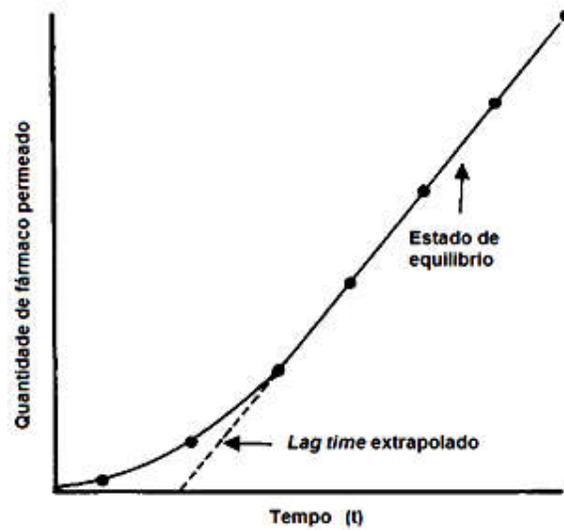


Figura 4. Curva de permeação, quantidade de fármaco permeado versus o tempo.
Fonte: ENGELHARDT, 2015.

Segundo Bourdon e colaboradores (2016), o fármaco deve atingir um fluxo alvo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) para que o mesmo obtenha ação sistêmica. Entretanto, para que o seu valor seja estimado, deve-se considerar os parâmetros exigidos pela Equação 2:

$$\text{Fluxo alvo} = \frac{\text{dose oral diária} \times \text{biodisponibilidade}_{\text{oral/IV}}}{\text{área de depósito} \times (24 - T_L)} \quad (2)$$

na qual: a área de depósito é a área de aplicação da formulação (cm^2).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Pesquisar a permeação transdérmica de TAX em forma farmacêutica creme.

3.2 Específicos

Inserir a TAX em uma emulsão pré-desenvolvida pelo grupo de pesquisa;

Desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE para a quantificação do princípio ativo durante os experimentos;

Estudar a solubilidade de TAX em meios receptores biorelevantes com o intuito de selecionar a melhor solução para o ensaio de permeação;

Realizar o ensaio de permeação cutânea da TAX em pele humana;

Calcular o balanço de massas do estudo, determinando a concentração de TAX no meio receptor, no bastão de espalhamento, no estrato córneo e no conjunto derme-epiderme;

Determinar a porcentagem permeada de TAX, por dose aplicada, no período de 24h.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e padrão analítico

No preparo da fase móvel para as análises por CLAE foram empregados a acetonitrila grau CLAE (Panreac, Espanha) e o ácido fórmico (Neon, Brasil) grau analítico. Para o preparo dos meios receptores, foram utilizados: cloreto de sódio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico, todos de grau analítico, provenientes da empresa Neon Comercial Ltda (Brasil). Água ultrapura, obtida de um sistema AquaMAX – Ultra 370 Series (Young Lin Instrument, Coréia do Sul), com resistividade de 18,2 MΩcm, foi utilizada durante as análises.

Como padrão analítico foi empregada a TAX (Sigma Aldrich, EUA). A potência utilizada para a mesma foi aquela referida no certificado de análise do fabricante (86,8 %). Toda a fase móvel e os meios receptores foram filtrados a vácuo em membrana de filtro de fluoreto de polivinilideno (Sartorius, Alemanha) com porosidade de 0,45 µm e degaseificados em banho de ultrassom (Cristófoli, Brasil) por 30 min antes do uso. Todas as soluções preparadas foram filtradas em membrana de celulose regenerada (Macherey-Nagel, Alemanha) de 0,45 µm de porosidade e transferidas para frascos cromatográficos antes das injeções no sistema. Todos os procedimentos descritos foram realizados ao abrigo da luz.

4.2 Manipulação da forma farmacêutica

A base galênica utilizada para incorporar a TAX caracteriza-se por ser uma emulsão percutânea fosfolipídica com promotores de permeação. A mesma foi previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa e a sua composição qualitativa pode ser descrita em 5 fases: fase A - álcool cetílico, álcool estearílico, glicerol, simeticona, ácido esteárico; fase B - ácido sórbico, palmitato de isopropila, hidroxitolueno butilado, lecitina de soja; fase C - ureia, ácido benzóico, ácido sórbico, monoestearato de propilenoglicol, goma xantana, etoxidiglicol, edetato, água

destilada; fase D - aminometil propanol; fase E: polaxâmero e dextro-alfa-tocoferol. O veículo foi produzido seguindo cinco processos: (i) primeiro, as fases A, B e C foram aquecidas até 70 °C; (ii) depois a fase C e a fase D foram adicionadas à fase A, misturadas e depois adicionadas à fase B; (iii) o calor foi interrompido e uma mistura rigorosa foi realizada; (iv) quando à temperatura ambiente, a fase E foi adicionada ao sistema (PEREIRA et al., 2017). Em seguida, a base teve o seu pH ajustado com solução de ácido cítrico a 20 % (pH = 4,60).

A formulação foi composta de 0,5 % de TAX (50 mg – valor corrigido para 57,6 mg, considerando a potência do padrão utilizado e uma margem de perda durante a manipulação de 2,5 %), 0,1 % de metabissulfito de sódio (Neon Comercial Ltda, Brasil), 1,5 % de DMSO (Neon Comercial Ltda, Brasil) e quantidade suficiente de base para 10 g. A TAX foi exatamente pesada em balança analítica digital (AY220, Shimadzu, Japão) e transferida para um gral de vidro, onde foi adicionado o metabissulfito de sódio (antioxidante). O DMSO foi adicionado gota a gota ao conjunto (TAX + metabissulfito de sódio) e os componentes foram então homogeneizados com o veículo. O produto foi armazenado em bisnaga de alumínio e conservado sob refrigeração.

4.3 Desenvolvimento do método analítico

4.3.1 Preparo das soluções padrão e amostra

Foram pesados 1 g de formulação (equivalente a 5,0 mg de TAX) em um béquer de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de acetonitrila e o béquer foi deixado em banho ultrassônico por 30 min. Após, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com quantidade suficiente do mesmo solvente através de lavagens sucessivas do béquer. A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, para a retenção dos excipientes, e uma alíquota de 5 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com quantidade suficiente de acetonitrila. O padrão foi preparado da mesma maneira, excetuando-se o fato de que foram pesados 10 mg e transferidos para um balão

volumétrico de 10 mL. A segunda diluição foi realizada a partir da transferência de uma alíquota de 500 µL para um balão volumétrico de 10 mL (concentração final da amostra e do padrão = 50 µg.mL⁻¹, soluções de trabalho ou soluções na concentração de 100 %). O placebo (base sem o ativo) foi submetido ao mesmo procedimento realizado para a amostra.

4.3.2 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatográfico qualificado e calibrado Young Ling (Coreia do Sul) composto por bomba quaternária (YL 9110), degaseificador (YL 9101), detector de arranjo de fotodiodos (PDA) (YL 9160), injetor automático (YL 9150), compartimento de coluna com forno (YL 9130) e *software* de controle (Clarity). A separação cromatográfica foi atingida utilizando coluna C18, 250 x 4,6 mm, tamanho de partículas de 5 µm (Agilent, Brasil). A coluna foi conectada com uma pré-coluna C18, 4,0 x 3,0 mm, 5 µm de tamanho de partículas (Phenomenex, EUA). A fase móvel estabelecida inicialmente, após testes de triagem, foi constituída por uma mistura de acetonitrila e água (50:50, v/v) acidificada com 1 % de ácido fórmico.

Com a finalidade de minimizar o tempo, o consumo de reagente e otimizar os fatores do sistema cromatográfico, uma abordagem quimiométrica foi realizada. Um planejamento experimental completo com 8 experimentos (2³) e triplicata no ponto central foi realizado e as variáveis consideradas foram: (X1) tempo de ultrassom para a dissolução da amostra (25, 30 e 35 min), (X2) porcentagem de solvente orgânico na fase móvel (45, 50 e 55 %) e (X3) temperatura do compartimento para a coluna (35, 40 e 45 °C). Todos os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória e foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: (i) fator capacidade (K'), (ii) eficiência (número de pratos teóricos/metro), (iii) tempo de retenção e (iv) simetria do pico. Outras condições experimentais foram mantidas constantes, como: fluxo da fase móvel (0,5 mL.min⁻¹), volume de injeção (20 µL) e detecção por UV (288 nm).

4.4 Validação do método analítico

Após a otimização do método analítico, o mesmo foi validado conforme as diretrizes do INMETRO (2011) e a Resolução RDC nº 899 (BRASIL, 2003), que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil. Os parâmetros avaliados foram: robustez, especificidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

4.4.1 Robustez

Para a avaliação da robustez, foi empregado o mesmo planejamento conduzido na otimização. A partir dos resultados obtidos para cada experimento, os coeficientes para a determinação do modelo estatístico de previsão foram calculados segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010), de acordo com a Equação 3.

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y \quad (3)$$

Na qual b é a matriz de coeficientes do modelo, X e y são a matriz X e o vetor y , respectivamente. Para escrever a equação do modelo ajustado, foram calculados os erros padrão dos coeficientes através da Equação 4.

$$\varepsilon(b) = \sqrt{(X^t X)^{-1} \cdot \sigma^2} \quad (4)$$

Onde $\varepsilon(b)$ é a matriz cuja diagonal principal representa os erros padrão dos estimadores do modelo (b_i) e σ^2 é a variância populacional dos experimentos, que pode ser estimada como s^2 , utilizando as réplicas no ponto central, a partir da Equação 5.

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \quad (5)$$

Os efeitos foram calculados matricialmente pelo produto Xty , no qual y é o vetor coluna contendo a média dos resultados dos ensaios. Para a estimativa do erro padrão de cada efeito, a raiz quadrada do valor obtido na Equação 6 foi utilizada e o erro padrão da média foi estimado empregando a raiz quadrada do valor obtido na Equação 7.

$$\hat{V}_{efeito} = \left(\frac{S^2}{2}\right) \quad (6)$$

$$\hat{V}_{média} = \left(\frac{S^2}{n}\right) \quad (7)$$

Com a estimativa dos erros padrão, foram estabelecidos intervalos de confiança para os valores dos efeitos usando a distribuição t de *Student*, com 95 % de confiança, pela Equação 8.

$$\hat{\eta} - t_v \cdot S_{(efeito)} < \eta < \hat{\eta} + t_v \cdot S_{(efeito)} \quad (8)$$

Na qual η representa o verdadeiro valor de um efeito (valor populacional), $\hat{\eta}$ representa o valor obtido a partir dos ensaios realizados no experimento, t_v a distribuição de *Student* e S (efeito), o erro padrão de um efeito.

4.4.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada pela comparação das áreas dos picos ($n = 6$) obtidos para a TAX padrão e na amostra na concentração de trabalho. Através dessas determinações, foi calculado o grau de discrepância entre as áreas obtidas utilizando a Equação 9.

$$\%_{discrepância} = \frac{\bar{X}_a - \bar{X}_p}{\bar{X}_p} \quad (9)$$

Na qual \overline{Xa} é a média das áreas referentes à detecção de TAX na amostra e \overline{Xp} é a média das áreas referentes à detecção de TAX no padrão. O critério de aceitação foi definido como uma porcentagem de discrepância inferior a 2 % (AEFI, 2001).

4.4.3 Linearidade

Para a determinação da linearidade, três curvas analíticas foram plotadas a partir de cinco concentrações de TAX ($n = 3$ réplicas para cada nível de concentração), no intervalo de 80 a 120 % em relação à concentração da solução de trabalho. O método dos mínimos quadrados foi aplicado para a determinação da curva analítica e de seu coeficiente de determinação. Com a finalidade de avaliar estatisticamente a linearidade e o ajuste do modelo, os dados de cada nível de concentração foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

4.4.4 LD e LQ

Os limites foram determinados a partir das três curvas analíticas obtidas na linearidade da amostra e calculados a partir das Equações 10 e 11 a seguir:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (10)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (11)$$

em que, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva analítica.

4.4.5 Precisão

O teste de precisão objetivou avaliar o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas por um mesmo analista em um único dia (precisão intracorrída, repetibilidade, $n_{total} = 6$) e entre dois analistas, em dois dias diferentes (precisão intercorrída; precisão intermediária, $n_{total} = 24$), para soluções na concentração de trabalho. A precisão pode ser expressa como desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas, sendo valores menores ou iguais a 5 % considerados satisfatórios (BRASIL, 2003).

4.4.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação, onde a amostra foi fortificada com concentrações conhecidas de padrão, equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração de trabalho. A área do pico cromatográfico atribuída somente ao padrão foi calculada através da diferença entre a área do padrão + amostra e somente a área da amostra. O resultado foi expresso em porcentagem de recuperação, relacionando a concentração média determinada experimentalmente, oriunda da curva analítica do padrão, com a concentração teórica correspondente. Resultados compreendidos entre 98 e 102 % foram considerados satisfatórios.

4.5 Seleção do meio receptor para o ensaio de permeação

Para os testes de permeação, foram testados meios receptores biorelevantes, com o intuito de determinar qual é o mais adequado para a solubilização de TAX. O preparo do meio receptor foi de acordo com Baert e colaboradores (2010) e a composição dos mesmos (soluções aquosas) está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios biorelevantes utilizados para os testes de permeação de TAX.

Componentes	Tampão fosfato salino 0.01 M, pH 7,4 (mM)	Suor humano artificial (mM)	Fluido corporal simulado (mM)
NaCl	138,00	49,96	136,80
KCl	2,70	-	3,00
CaCl ₂	-	0,15	2,50
MgSO ₄	-	1,00	-
MgCl ₂	-	-	1,50
Na ₂ SO ₄	-	-	0,50
NaHCO ₃	-	-	4,20
KH ₂ PO ₄	1,43	7,50	1,00
Na ₂ HPO ₄	8,57	-	-

NaCl: cloreto de sódio; KCl: cloreto de potássio; CaCl₂: cloreto de cálcio; MgSO₄: sulfato de magnésio; MgCl₂: cloreto de magnésio; Na₂SO₄: sulfato de sódio; NaHCO₃: bicarbonato de sódio; KH₂PO₄: dihidrogenofosfato de potássio; Na₂HPO₄: hidrogenofosfato dissódico.

A solubilidade da TAX foi determinada nos meios descritos e nestes acrescidos de 20 % de etanol. Devido à baixa solubilidade da TAX em água (WEIDMANN, 2012; ZU et al., 2014a), o etanol foi empregado para aumentar a sua solubilidade nas soluções aquosas testadas, sendo permitido o acréscimo de até 50 % de etanol nos meios receptores (COLIPA, 1997; OECD, 2011). Para a realização do procedimento, foram exatamente pesados 10 mg de TAX em tubos de ensaio, onde 10 mL do meio receptor foram adicionados. Os tubos foram deixados em banho ultrassônico por 30 min e então incubados em estufa a 32 °C (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) por 12 h. Posteriormente, eles foram centrifugados a 20.000 × g (Fanem, Brasil), o sobrenadante diluído em uma proporção 0,5 : 10 (v/v), seguido por transferência para *vials* cromatográficos para a quantificação da TAX, segundo as condições do método desenvolvido para a formulação. O meio, contendo ou não o etanol, foi definido, sendo utilizada a condição que apresentou a melhor solubilização da TAX.

4.6 Preparo da pele humana

Pele humana da região abdominal foi obtida de um paciente que foi submetido à abdominoplastia (um doador: mulher de 48 anos, sem doença prévia de

pele). A pele foi recolhida imediatamente após a cirurgia e inspecionada visualmente para assegurar que estava saudável e que não foi alterada pelas condições clínicas de remoção. O transporte do material foi realizado em menos de 30 min e o mesmo foi mantido em recipiente isotérmico a 4 °C.

No laboratório, a gordura subcutânea e o tecido conjuntivo foram imediatamente removidos da pele com o auxílio de um bisturi (Figura 5). A pele foi lavada com água e solução salina, envolvida em Parafilm® e armazenada a -80 °C antes da utilização, num período inferior a 1 mês. A pele foi utilizada com sua espessura total. Foi retirada do freezer 10 min antes do uso para descongelar e foi cortada em forma de discos para serem encaixadas nas células de difusão vertical. Uma pré-avaliação de sua integridade foi realizada pelo controle da perda transepidermal de água (Vapometer®, Delfin, EUA).

Este protocolo seguiu o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinque) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil (protocolo n° 151.275, Anexo B).



Figura 5. Limpeza da pele humana. A. Pele recém-obtida do procedimento cirúrgico. B e C. Retirada do excesso de gordura subcutânea. D. Segmento de pele limpo obtido.

4.7 Estudo de permeação cutânea de TAX

O ensaio de permeação *ex vivo* foi realizado em células de difusão vertical estáticas de 7 mL, com amostrador automático (Microette Plus[®], Hanson Research, EUA). A câmara receptora foi preenchida com o meio receptor. Os segmentos de pele, após o descongelamento, foram previamente imersos em meio receptor 30 min antes do experimento, sendo adicionados à célula, com o estrato córneo (SC) faceando o compartimento doador e a derme em contato com a solução receptora, evitando-se sempre a formação de bolhas. Acima da pele foi colocado um anel de teflon (150 mm de diâmetro interno) e este teve o seu orifício totalmente preenchido pela emulsão (n = 4).

Uma dose finita da formulação (68 mg) foi aplicada com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva calibrada Pos-D MR-110 (Rainin, EUA) e foi distribuída uniformemente com um bastão de espalhamento de vidro sobre a superfície da membrana. A área de difusão disponível foi de 1,86 cm². A formulação foi ocluída por disco de acrílico e o sistema foi fechado com uma garra metálica para evitar que o meio receptor evaporasse (Figura 6). O meio foi mantido a temperatura de 32 ± 2 °C durante todo o experimento, sob agitação (600 rpm) por meio de uma barra de agitação magnética.

Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos regulares de tempos (0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 16, 20 e 24 h), recolhidas em *vials* cromatográficos e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas para o método analítico. Uma lavagem dos tubos de amostragem automática foi realizada com 1,5 mL do meio, 30 s antes de cada coleta, e a agitação foi interrompida durante esta lavagem. As alíquotas retiradas foram repostas a cada coleta com meio receptor, à mesma temperatura, para manter o volume constante no interior das células.

As concentrações correspondentes de TAX foram corrigidas para estabelecer a quantidade real de fármaco difundida no tempo t ($Q_{real,t}$). Essa correção foi realizada considerando a Equação 12:

$$Q_{real,t} = C_{calculada,t} \cdot V_r \cdot V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (12)$$

na qual: $C_{\text{calculada},t}$ é a concentração da amostra determinada no tempo t , V_r é o volume da célula de difusão, V_a é o volume da alíquota e C_a é a concentração da alíquota.

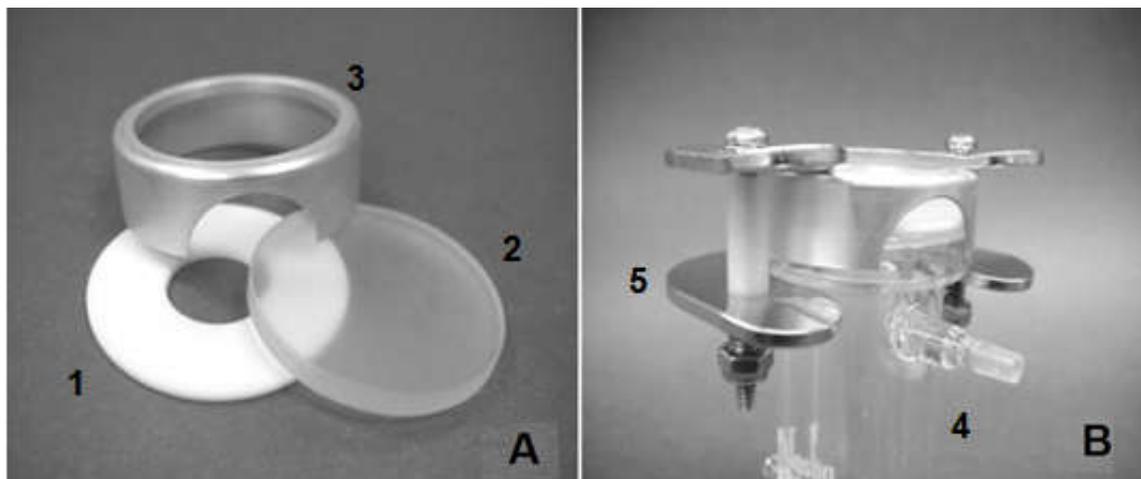


Figura 6. Montagem da parte superior da célula de Franz. A. anel de teflon branco (1), disco de acrílico (2) e anel metálico para selagem (3). B. Célula (4) selada com o auxílio de uma garra metálica (5).

Fonte: Adaptado de BEMVINDO, 2006.

Após os experimentos de permeação, foi realizado o cálculo de recuperação média dos experimentos. Este pode ser determinado pelo somatório do princípio ativo detectado durante os experimentos (retido no bastão de espalhamento, presente no meio receptor e retido na pele) dividido pelo valor total aplicado à célula. Desta forma, o espalhador utilizado durante a aplicação da formulação foi posteriormente rinsado com a fase móvel do método analítico e a solução obtida foi analisada por CLAE.

4.7.1 Retenção de TAX na pele

Após os experimentos de permeação, cada disco de pele foi retirado das células para analisar a retenção de TAX em suas camadas. O estrato córneo foi separado do conjunto derme/epiderme utilizando a técnica do *tape stripping*. Fitas adesivas Scotch (3M, Alemanha) (25 x 25 mm²) foram aderidas, consecutivamente, na área exposta ao produto, até que todas as camadas de células viáveis do estrato

córneo fossem retiradas (aproximadamente 20 fitas). As fitas foram colocadas em tubos cônicos de polipropileno de 10 mL contendo 3 mL de acetonitrila. O restante da pele foi picotado e, da mesma forma que as fitas, foi colocado em tubos cônicos contendo 3 mL de acetonitrila. Os tubos foram deixados em banho de ultrassom por 1 h e as soluções obtidas foram filtradas em membranas de 0,45 μm , transferidas para *vials* cromatográficos e analisadas por CLAE. As concentrações de TAX foram corrigidas para todas as diluições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método analítico

Durante o preparo da formulação, a dosagem de TAX na emulsão (0,5 %, m/m) foi escolhida baseando-se em concentrações utilizadas em pesquisas cuja atividade anti-inflamatória foi investigada (CHOI et al., 2011; KANG et al., 2010).

Posteriormente, foram realizadas as análises cromatográficas do creme contendo TAX e foram estabelecidas as seguintes condições iniciais: coluna e pré-coluna C18; volume de injeção = 20 μL ; fluxo da fase móvel = 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; detecção por espectrofotometria, com varredura entre os comprimentos de onda de 190 e 900 nm (neste caso, a resposta máxima foi obtida em 288 nm); e uma mistura de acetonitrila e água (50:50, v/v) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (pH = 2,4) como fase móvel de triagem inicial. A acidificação da fase móvel foi realizada de forma a garantir um pH adequado (entre 2 e 3) para a análise de flavonoides (KRUGER; GANZERA, 2012; ZUCOLOTTO et al., 2012).

A seguir, foi realizado um estudo preliminar de solubilização da amostra e extração de TAX a partir da formulação. O solvente mais apropriado e o tempo de banho de ultrassom foram avaliados. O emprego de acetonitrila como solvente extrator e um tempo de ultrassom estabelecido em 30 min, permitiu uma adequada solubilização da formulação, conduzindo a resultados de teores dentro da faixa adotada (90 – 110 %). Portanto, tais condições foram estabelecidas como iniciais. Isso posto, um planejamento experimental do tipo 2^3 com triplicata no ponto central foi conduzido para a otimização das condições do método. A matriz X e os vetores y foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições de análise do creme de TAX.

Ensaio	Média	Matriz X							Teor (%)	Vetores Y			
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₁₂	X ₁₃	X ₂₃	X ₁₂₃		TR (min)	N	K'	S
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	102,82	5,72	5202	1,75	1,30
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	102,89	5,69	5142	1,73	1,32
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	102,21	5,07	7614	0,22	1,32
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	103,42	5,06	7422	0,22	1,30
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	102,18	5,63	5420	1,71	1,33
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	103,24	5,65	5561	1,72	1,27
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	102,05	5,03	8085	0,21	1,27
8	1	1	1	1	1	1	1	1	101,97	5,02	8053	0,21	1,25
9	1	0	0	0	0	0	0	0	102,58	5,24	6461	0,27	1,33
10	1	0	0	0	0	0	0	0	101,99	5,29	6387	0,27	1,32
11	1	0	0	0	0	0	0	0	102,50	5,29	6400	0,26	1,33

X1: tempo de ultrassom para a dissolução da amostra (min) [(-1): 25; (0): 30; (1): 35].

X2: porcentagem de acetonitrila na fase móvel [(-1): 45; (0): 50; (1): 55].

X3: temperatura do compartimento da coluna (°C) [(-1): 35; (0): 40; (1): 45].

TR: tempo de retenção.

N: eficiência da coluna (número de pratos teóricos/metro). Valores esperados: ≥ 2000 .

K': fator capacidade. Valores esperados: $\geq 1,00$.

S: simetria do pico. Valores esperados: $\leq 2,00$.

Todos os ensaios apresentaram combinações de fatores que forneceram resultados de teores satisfatórios (entre 101,97 % e 103,42 %) e os tempos de retenção foram de aproximadamente 5 min. Entretanto, os ensaios 3, 4, 7, 8, 9, 10 e 11 forneceram valores abaixo da especificação (≥ 1) para o fator capacidade. O fator capacidade é obtido pela razão entre o tempo de permanência do analito na fase estacionária e o seu tempo de permanência na fase móvel. Portanto, fatores de retenção menores que 1 indicaram que o analito eluiu rapidamente, podendo isto ocorrer antes do tempo morto (tempo em que uma espécie não retida demora para atingir o detector), condição não adequada para as análises cromatográficas. Partindo desses pressupostos, optou-se por trabalhar com a menor concentração de acetonitrila (ensaios 1, 2, 5 e 6). Dentre eles, a condição 6 foi escolhida, pois forneceu uma resolução melhor entre o pico principal da TAX e o interferente que elui em seguida. Os cromatogramas obtidos a partir das condições de análise escolhidas no ensaio 6 foram apresentados na Figura 7.

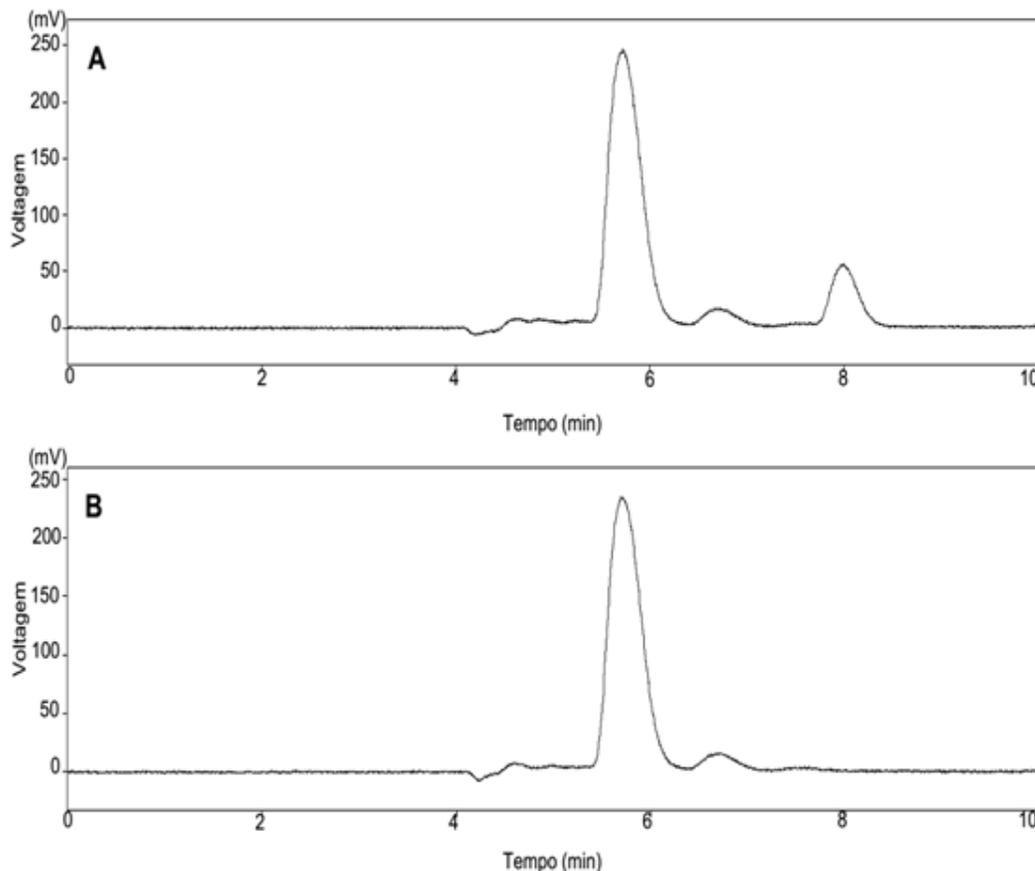


Figura 7. Cromatogramas resultantes das condições selecionadas para o método de análise. A: amostra; B: padrão de TAX. Condições cromatográficas definidas: coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) a 45 $^{\circ}$ C; volume de injeção de 20 μ L; fase móvel composta de acetonitrila:água (45:55, v/v), acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (pH = 2,4); fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e detecção a 288 nm.

5.2 Validação do método analítico

Após a otimização do método, o mesmo foi validado segundo as diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2003) e do INMETRO (2011). Atualmente, foi publicada uma nova resolução RDC n 166 (BRASIL, 2017) sobre a validação analítica no Brasil. Embora esta esteja em vigor, o trabalho foi iniciado antes da publicação da mesma e, portanto, segue a RDC n 899.

A robustez do método foi realizada através de um planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central. Os valores calculados, com 95 % de confiança, para os principais efeitos e suas interações foram apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Fatores do planejamento experimental conduzido para o estudo da robustez e seus respectivos efeitos e erros-padrão calculados para o teor de TAX.

Efeitos dos ensaios	
Média:	102,53 ± 0,10
Principais efeitos:	
X ₁ tempo de ultrassom para a solubilização da amostra(min)	0,56 ± 0,23
X ₂ porcentagem de acetonitrila na fase móvel	-0,37 ± 0,23
X ₃ temperatura do compartimento da coluna (°C)	-0,48 ± 0,23
Interações de dois fatores:	
X ₁₂	0,01 ± 0,23
X ₁₃	-0,08 ± 0,23
X ₂₃	-0,33 ± 0,23
Interações de três fatores:	
X ₁₂₃	-0,57 ± 0,23
t₀ x S(efeito)	0,98

A análise dos resultados evidenciou que não houve variações estatisticamente significativas a 95 % de confiança para os valores de teor de TAX, indicando a confiança na utilização do método para fins quantitativos, mesmo que pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos ocorram no decorrer da análise.

Os resultados da especificidade foram determinados pelo cálculo da porcentagem de discrepância, pela comparação entre as áreas cromatográficas do analito sozinho e do analito + matriz. O cálculo da porcentagem de discrepância forneceu um valor inferior a 2 % (=1,19 %), indicando que não houve diferença significativa entre a quantificação da TAX padrão e na formulação.

Os dados obtidos para as curvas analíticas/linearidade do método, bem como os limites de detecção e de quantificação e os resultados para os testes de precisão e exatidão foram apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos para a linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

Parâmetros		Resultados	Limites de especificação
Linearidade			
Equação da regressão linear	n = 3	y = 114398,36x - 238803,34	
R ²		0,9989	≥ 0,99
F _{cal} Regressão		11974,67	
F _{cal} Falta de ajuste		3,36	
LD (µg.mL ⁻¹)	n = 3	4,44	
LQ (µg.mL ⁻¹)	n = 3	8,12	
Precisão			
CV (%) Repetibilidade	n = 12	0,98	CV ≤ 5%
CV (%) Precisão intermediária	n = 24	1,13	
Exatidão			
Recuperação média (%)	n = 15	100,85	98,0 – 102,0%

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CV: coeficiente de variação; R²= coeficiente de determinação; Intervalo (µg.mL⁻¹): (40-60); ANOVA: F_{crítico} da regressão (4.67); F_{crítico} da falta de ajuste (3,71).

Para avaliar a linearidade foram construídas curvas analíticas ($x = \mu\text{g.mL}^{-1}$, $y = \text{mV}$) do composto de interesse ($n = 3$). O estudo da linearidade foi sujeito ao método dos mínimos quadrados e foi obtido um coeficiente de determinação maior que 0,99. Os dados foram avaliados através da ANOVA. O teste de significância da regressão gerou valor de $F_{\text{calculado}}$ maior que $F_{\text{crítico}}$ e o teste da falta de ajuste valor de $F_{\text{calculado}}$ menor que $F_{\text{crítico}}$. Pode-se afirmar, com 95 % de confiança, que existe uma relação linear entre as variáveis e que não existe falta de ajuste no modelo para a faixa de concentração estudada. Dessa forma, a equação modelo utilizada foi capaz de prever as concentrações de TAX na formulação, obtendo-se resultados muito próximos aos valores reais da amostra.

Os LD e LQ foram calculados a partir das curvas analíticas obtidas e forneceram a comprovação de que os intervalos de concentrações de trabalho escolhidos foram capazes de detectar e quantificar a TAX com precisão e exatidão aceitáveis.

O ensaio de precisão foi avaliado através da repetibilidade e da precisão intermediária. Todos os coeficientes de variação obtidos estão dentro do limite preconizado pela legislação ($\leq 5\%$). Estes valores comprovaram a capacidade do método de proporcionar resultados próximos para uma série de medidas de uma mesma amostra, nas mesmas condições experimentais (repetibilidade) e, sujeito a variações de analista e dia (precisão intermediária).

A exatidão foi avaliada, para ambos os métodos, por meio do teste de recuperação. A taxa de recuperação média obtida (100,85 %) encontrou-se dentro da especificação (entre 98 e 102 %). Esse valor demonstrou a capacidade do método de fornecer resultados próximos ao valor verdadeiro.

Diante do estudo dos parâmetros de validação analítica, pode-se dizer que, do ponto de vista prático, que o método foi validado para as finalidades pretendidas.

5.3 Seleção do meio receptor para o ensaio de permeação

Os resultados da solubilidade máxima obtidos para a TAX nos meios receptores testados foram representados na Tabela 5. Considerando todos os meios sem o acréscimo de solvente orgânico, o suor humano artificial foi o que apresentou melhor solubilização da TAX (80,91 %). Entretanto, o acréscimo de 20 % de etanol nesse meio representou um aumento de 14 % na solubilidade da TAX (94,91 %). Considerando os resultados, optou-se por trabalhar com o mesmo.

Tabela 5. Resultados da solubilidade máxima de TAX nos meios receptores testados.

Meio receptor	Solubilidade de TAX ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solubilidade de TAX (%)
Tampão fosfato salino pH 7,4	38,92	79,37
Tampão fosfato salino pH 7,4 + 20 % etanol	42,92	87,52
Suor humano artificial	39,81	80,91
Suor humano artificial + 20 % etanol	47,12	94,91
Fluido corporal simulado	38,20	77,90
Fluido corporal simulado + 20 % etanol	40,20	81,98

A utilização de um meio receptor fisiológico é sempre preferível para que se possa estabelecer melhor uma correlação *in vitro/in vivo*. Entretanto, um dos pré-requisitos para a realização dos ensaios de permeação é que o meio receptor permita a adequada solubilização da substância de interesse, não limitando a sua difusão através da membrana biológica (BAERT et al., 2010). Dessa forma, soluções contendo solvente orgânico como o etanol podem ser utilizadas para estudos com substâncias lipofílicas (ENGELHARDT, 2015).

5.4 Estudo de permeação cutânea de TAX

A TAX apresenta-se como um composto promissor para o tratamento de diversas condições relacionadas à pele. Dados científicos demonstram a sua capacidade de atuar como anti-inflamatório (CHOI et al., 2011), hipopigmentante (ASMI et al., 2017), antioxidante (SUN et al., 2014; LIANG et al., 2013) e na prevenção de carcinogênese induzida pela exposição da pele a raios UV (OI et al., 2012). Triagens *in vivo* com experimentos em camundongos demonstraram que a TAX possui efeitos positivos no tratamento de lesões semelhantes à dermatite atópica (KIM et al., 2015) ou em queimaduras (SHUBINA; SHATALIN, 2012), ambas induzidas quimicamente.

A TAX possui baixo peso molecular ($304,25 \text{ g.mol}^{-1}$) e um coeficiente de partição de 0,95, valor próximo ao considerado ideal ($\log P$ entre 1 e 3) para que fármacos ultrapassem a barreira do estrato córneo pela rota intercelular (BENSON; WATKINSON, 2012). Baseado nesses dados e em suas propriedades farmacológicas, torna-se relevante a realização de ensaios que avaliem a sua absorção pela pele.

O atual trabalho realizou ensaios de permeação em pele humana para a TAX. A mesma foi inserida em uma emulsão e os experimentos foram realizados durante um período de 24 h. Alguns critérios relacionados à membrana também foram considerados para o cálculo de massas durante os experimentos.

As propriedades de permeabilidade da pele são preservadas após a excisão do corpo porque a principal barreira à permeação é o estrato córneo. Entretanto, o ambiente da pele *in vivo* difere em parte do ambiente *ex vivo*. A mesma encontra-se vascularizada *in vivo* e a contínua perfusão vascular na derme pode remover rapidamente os permeantes que atingem a junção derme-epiderme. No ambiente *ex vivo*, a perfusão sanguínea não ocorre, caso os vasos ainda estejam presentes. Isso nos permite dizer que, em condições *ex vivo*, o fármaco presente na junção derme-epiderme seria capaz de alcançar a corrente sanguínea se estivesse em condições *in vivo*. As quantidades que são retidas pelo estrato córneo não são consideradas absorvidas dermicamente e, portanto, não se espera que contribuam para a dose sistêmica (ENGELHARDT, 2015).

Dessa forma, a quantidade real de fármaco permeada foi calculada não apenas pela quantificação de fármaco no meio receptor, mas foi definida como a soma do fármaco retido na camada de pele viável (epiderme e derme, excluindo o estrato córneo) e no meio receptor. O Gráfico 1 e a Tabela 6 apresentam o resultado do cálculo de balanço de massas do estudo.

Tabela 6 – Balanço de massas do estudo de permeação *ex vivo* da TAX em pele humana.

Parâmetro	TAX
Quantidade teórica de creme aplicada na pele (mg) ^a	68,00
Quantidade aplicada de TAX (µg) ^b	387,60
Quantidade de TAX retida no bastão de espalhamento (µg)	238,35
Quantidade de TAX retida no estrato córneo (µg)	83,40
Quantidade de TAX retida no conjunto derme e epiderme (µg)	71,78
Quantidade de TAX quantificada no meio receptor (µg)	0,00
Quantidade total permeada após 24 h (µg) ^c	71,78
Porcentagem de permeação por dose (%) ^d	48,09%
Total de recuperação (%) ^e	101,53

a: Quantidade total de formulação aplicada na câmara doadora; b: Quantidade aplicada de TAX considerando a concentração desta na formulação (0,5 % m/m); c: TAX quantificada no meio receptor e no conjunto derme e epiderme; d: Quantidade total de TAX passível de permeação, de acordo com a dose aplicada $[(c/b) \times 100]$; e: Quantidade total de TAX recuperada (somatório da quantidade detectada no bastão de espalhamento, na derme e epiderme e no meio receptor dividida pela quantidade total de TAX aplicada). Resultado expresso como porcentagem ($\times 100$).

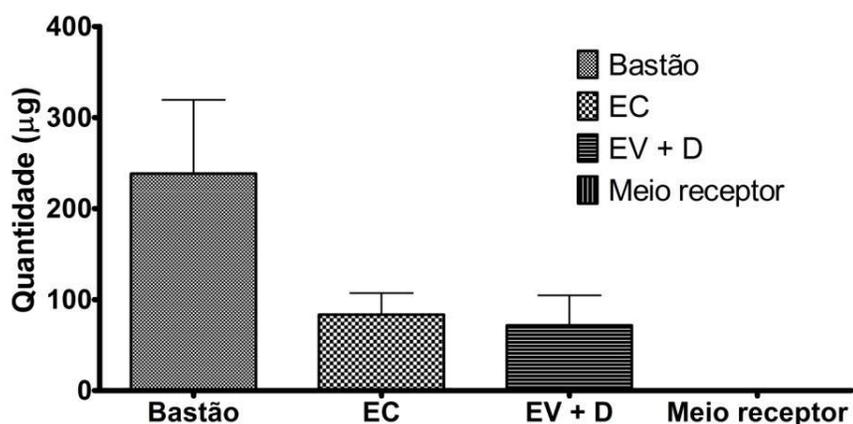


Gráfico 1. Balanço de massas resultante do estudo de permeação *ex vivo* da TAX.

Resultados expressos como média \pm erro padrão (n = 4). EC: estrato córneo; EV: epiderme viável; D: derme.

O balanço de massas apresentou uma recuperação média (101,53 %) com valor satisfatório e dentro dos critérios de aceitação para ensaios de permeação

(entre 85 % e 115 %) (FDA, 2015). Dessa forma, todo o fármaco aplicado foi quantificado, sem que houvesse perda durante o processo.

O monitoramento da passagem do princípio ativo deve ser monitorada pela quantificação do mesmo nas amostras do meio receptor em diferentes tempos. Dessa forma, o gráfico da quantidade acumulada de fármaco no meio em função do tempo pode fornecer o seu perfil de liberação (FERREIRA, 2015; USP, 2014). A partir da plotagem desse gráfico e da regressão linear obtida, é possível calcular na prática o fluxo do fármaco no estado estacionário e o seu tempo de latência (T_L) (CHANTASART; HAO; LI, 2013). Além disso, o T_L obtido pode ser utilizado para o cálculo do fluxo alvo do fármaco necessário para que o mesmo obtenha ação sistêmica, juntamente com dados como dose oral diária, biodisponibilidade oral/IV e a área de depósito (BOURDON et al., 2016).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, nenhuma área em relação ao meio receptor foi detectada. Dessa forma, não foi possível construir o seu perfil ou calcular nenhum parâmetro relacionado à sua cinética de difusão. A indisponibilidade do valor do T_L e de dados como a dose oral diária e a biodisponibilidade oral/IV pesquisados em literatura inviabilizaram o cálculo do fluxo alvo.

A análise do gráfico e do balanço de massas nos permitiu observar que a maior quantidade ficou retida no bastão de espalhamento (238,35 μg). Isso demonstrou o fato de que, talvez o espalhamento não tivesse sido realizado durante um tempo adequado ou que a quantidade de formulação aplicada pudesse ser menor.

O restante do fármaco quantificado foi dividido entre o estrato córneo (83,40 μg) e a camada viável da pele (71,78 μg). A porcentagem passível de permear foi calculada através da relação entre a quantidade com potencial de permeação *in vivo* e a quantidade de TAX efetivamente aplicada à célula doadora. A porcentagem de permeação por dose foi de 48,09 %. Clinicamente, esse resultado sugere que, na matriz estudada, a TAX foi capaz de permear até a derme e que, possivelmente, as concentrações alcançadas de TAX possam ser suficientes para que a mesma exerça o seu efeito terapêutico de forma sistêmica. No entanto, o efeito clínico de TAX deve ser comprovado por estudos farmacocinéticos e pela biodisponibilidade *in vivo*.

Ensaio *in vivo* e a modificação da formulação com a introdução de intensificadores de permeação poderia constituir perspectivas futuras para a

continuidade deste trabalho de pesquisa. Alguns ácidos graxos presentes em óleos naturais como os ácidos oléico e linoléico, por exemplo, podem afetar a penetração de várias substâncias na pele. Além disso, são considerados componentes inertes e seguros que podem ser utilizados para estabilizar ou melhorar a solubilidade de fármacos em formulações farmacêuticas. Apresentam o potencial de desorganizar reversivelmente os lipídeos que encontram-se ordenados na pele, causando "dobras" nos mesmos (CIZINAUSKAS et al., 2017).

Cizinauskas e colaboradores (2017) avaliaram o efeito de óleos naturais na distribuição de TAX nas camadas da pele. O ensaio *ex vivo* foi realizado em pele humana e o princípio ativo foi dissolvido (0,5 %, m/m) em polietilenoglicol 400, em adição com óleos obtidos a partir de sementes de soja e azeitona. Em seguida, houve a quantificação de TAX nas camadas da epiderme e derme. Os óleos testados foram capazes de aumentar significativamente a distribuição de TAX nessas camadas. Os resultados apresentados por esses autores demonstraram a possibilidade da introdução desses intensificadores à formulação ou mesmo o estudo de novos óleos naturais para intensificar a penetração de TAX na pele e possibilitar a sua permeação e absorção sistêmica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados descritos sugerem que, na matriz estudada, a TAX foi capaz de permear até a derme e que, possivelmente, as concentrações alcançadas de TAX possam ser suficientes para que a mesma exerça o seu efeito terapêutico de forma sistêmica. No entanto, existe a necessidade de ensaios *in vivo* para que seja comprovado o seu efeito clínico. Além disso, a introdução de intensificadores de permeação à formulação poderia aumentar a penetração de TAX na pele e possibilitar a sua permeação e absorção sistêmica.

REFERÊNCIAS

- AEFI. Asociación Espanola de Farmaceuticos de la Industria. **Validación de Métodos Analíticos**. Barcelona: AEFI, 2001. 315p. Disponível em: <https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria>. Acesso em: 14 out. 2018.
- ALMEIDA, P. A. **Taxifolina: quantificação do flavonoide no extrato seco da casca de *Pinus pinaster* e avaliação da liberação *in vitro* e permeação vaginal *ex vivo***. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.
- ALVES, M. C.; ALMEIDA, P. A. de; POLONINI, H. C.; RAPOSO, N. R. B.; FERREIRA, A. de O.; BRANDÃO, M. A. F. Green tea in transdermal formulation: HPLC method for quality control and *in vitro* drug release assays. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 728-735, 2014.
- ALVES, M. C.; ALMEIDA, P. A.; POLONINI, H. C.; BHERING, C. A. P.; OLIVEIRA, F. A.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. Taxifolin: avaluation through *ex vivo* permeations on human skin and porcine vaginal mucosa. **Current Drug Delivery**, Beijing, v. 15, n. 8, p. 1123-1134, 2018.
- ANSARI, N.; BHARTI, R.; KADER, N. S. A.; MANDAVI, N.; VERMA, S.; KAUR, C. D.; SAHU, G. K.; SHARMA, H. Skin penetration enhancement in novel drug delivery system. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Sofia, v. 7, n. 6, p. 254-271, 2018.
- ARUTYUNYAN, T. V.; KORYSTOVA, A. F.; KUBLIK, L. N.; LEVITMAN, M. K.; SHAPOSHNIKOVA, V. V.; KORYSTOV, Y. N. Effects of taxifolin on the activity of angiotensin-converting enzyme and reactive oxygen and nitrogen species in the aorta of aging rats and rats treated with the nitric oxide synthase inhibitor and dexamethasone. **Age**, [S.l.], v. 35, n. 6, p. 2089-2097, 2013.
- ASMI, K. S.; LAKSHMI, T.; BALUSAMY, S. R.; PARAMESWARI, R. Therapeutic aspects of taxifolin – an update. **Journal of Advanced Pharmacy Education and Research**, Noida, v. 7, n. 3, p. 187-189, 2017.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 677p.
- BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin *in vitro* release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.35, n. 3, 272-282, 2009.

BAERT, B.; BOONEN, J.; BURVENICH, C.; ROCHE, N.; STILLAERT, F.; BLONDEEL, P. BOXCLAER, J. V.; SPIEGELEER, B. D. A New Discriminative Criterion for the Development of Franz Diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 13, n. 2, p. 218-230, 2010.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2009.

_____; _____. Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 260, n. 1, p. 234-245, 2017.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BAVASKAR, K.; JAIN, A.; PATIL, M.; KALAMKAR, R. The impact of penetration enhancers on transdermal drug delivery system: physical and chemical approach. **International Journal of Pharma Research and Review**, Kuala Lumpur, v. 4, n. 7, p. 14-24, 2015.

BEMVINDO, C. S. **Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice**. 1. ed. New Jersey: Wiley, 2012. 446p.

BETTONI, C. C. **Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por *tape stripping in vitro* em pele humana e suína**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

BHOWMIK, D.; DASARI, V.; DURAIVEL, S.; KUMAR, K. P. S. Recent trends in penetration enhancer used in transdermal drug delivery system. **The Pharma Innovation – Journal**, New Delhi, v. 2, n. 2, p. 127-134, 2013.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BOURDON, F.; LECOEUR, M.; LCONTE, L.; ULTRÉ, V.; KOUACH, M.; ODOU, P.; VACCHER, C.; FOULON, C. Evaluation of Pentravan[®], Pentravan[®] Plus, Phytobase[®], Lipovan[®] and Pluronic Lecithin Organogel for the transdermal administration of antiemetic drugs to treat chemotherapy-induced nausea and vomiting at the hospital. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 774-787, 2016.

BOUWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Skin lipid organization, composition and barrier function. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 30, n. 5, p. 388, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 26 out. 2017.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 48, de 6 de outubro de 2009. Dispõe sobre realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação, e cancelamento pós-registro de medicamentos e dá outras providências. Disponível em: <www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/100764-48?format=pdf>. Acesso em: 26 ago. 2017.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 17 abril 2012.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021 -1030, 2009.

CHANTASART, D.; HAO, J.; LI, S. K. Evaluation of skin permeation of β -blockers for topical drug delivery. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 30, n. 3, p. 866-877, 2013.

CHOI, S. E.; PARK, K. H.; HAN, B. H.; JEONG, M. S.; SEO, S. J.; LEE, D. I.; JOO, S. S.; LEE, M. W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by phenolic compounds from roots of *Rhododendron mucronulatum*. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, n. 9, p. 1301-1305, 2011.

CIZINAUSKAS, V.; ELIE, N.; BRUNELLE, A.; BRIEDIS, V. Skin penetration enhancement by natural oils for dihydroquercetin delivery. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 9, p. 1-16, 2017.

COLIPA. The EuropeanCosmetic, Toiletry and PerfumeryAssociation. **Cosmetic ingredients: Guidelines for percutaneous Absorption/Penetration**. Bruxelas: COLIPA, 1997, 36 p.

COUTO, A.; FERNANDES, R.; CORDEIRO, M. N. S.; REIS, S. S.; RIBEIRO, R. T.; PESSOA, M. Dermic diffusion and stratum corneum. A state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 74-83, 2014.

DANIELS, R. Strategies for Skin Penetration Enhancement. CosmeticWeb. Disponível em:
<<http://www.skin-care-forum.basf.com/en/author-articles/strategies-for-skin-penetrationenhancement/2004/08/12?id=5b9a9164-6148-4d66-bd84-6df76bd6d111&mode=Detail>>.
Acesso em: 8 ago. 2017.

DRAGICEVIC, N. I.; MAIBACH, H. **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2015. 341 p.

_____; _____. **Percutaneous penetration enhancers drug penetration into/through the skin**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2017. 414 p.

EMA, European Medicines Agency. Public summary of opinion on orphan designation. Silibinin-C-2',3-dihydrogensuccinate, disodium salt for the prevention of recurrent hepatitis C in liver transplant recipients. Doc. Ref. EMA/COMP/642562/2010. Disponível em:
<http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/orphans/2011/01/human_orphan_000877.jsp&mid=WC0b01ac058001d12b&murl=menus/medicines/medicines.jsp>. Acesso em: 15 fev. 2018.

ENGELHARDT, R. L. **Avaliação do cenário regulatório de testes de permeação transdérmica de fármacos**. 2015. Dissertação (Mestrado em farmácia) – Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2015.

FDA. Food and Drug Administration. **Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry**. New Hampshire: FDA, 2015, 17 p.

FERREIRA, M. J. J. L. **Estudo não invasivo da permeação de rodamina B em pele através do método de fluorescência**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

FOX, L. T.; GERBER, M.; PLESSIS, J.; HAMMAN, J. H. Transdermal Drug Delivery Enhancement by Compounds of Natural Origin. **Molecules**, Postfach, v. 16, n. 12, p. 10507-10540, 2011.

GE, F.; TIAN, E.; WANG, L.; LI, X.; ZHU, Q.; WANG, Y.; ZHONG, Y.; GE, R. S. Taxifolin suppresses rat and human testicular androgen biosynthetic enzymes. **Fitoterapia**, Milano, v. 125, n. 1, p. 258-265, 2018.

GULATI, O. P. Pycnogenol® in chronic venous insufficiency and related venous disorders. **Phytotherapy Research**, London, v. 28, n. 3, p. 348-362, 2014.

GUNJKAR, V. N.; FIRKE, S. N.; SARJE, S. K.; ROGE, A. B. Transdermal Drug Delivery System: A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 148-153, 2015.

GUO, H.; ZHANG, X.; CUI, Y.; ZHOU, H.; XU, D.; SHAN, T.; WU, D. Taxifolin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 287, n. 2, p. 168-177, 2015.

GUY, R. H. Transdermal drug delivery. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 197, p. 399-410, 2010.

HATHOUT, R. M.; WOODMAN, T. J.; MANSOUR, S.; MORTADA, N. D.; GENEIDI, A. S.; GUY, R. H. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 188-196, 2010.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**: DOQ-CGCRE- 008. Brasília: INMETRO, 2011. 20 p.

JANEIRO, P.; CORDUNEANU, O.; BRETT, A.M.O. Chrysin and (±)-taxifolin electrochemical oxidation mechanisms, **Electroanalysis**, Coimbra, v. 17, n. 12, p. 1059-1064, 2005.

JASSIM, Z. E.; SULAIMAN, H. T.; JABIR, S. A. H. Transdermal drug delivery system: A review. **Journal of Pharmacy Research**, Kharar, v. 12, n. 5, p. 802-807, 2018.

JAWALE, N.; BHANGALE, C.; CHAUDHARI, M; DESHMUKH, T. A. Physical approach to transdermal drug delivery: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, Délhi, v. 7, n. 3, p. 28-35, 2017.

JHAWAT, V. C.; SAINI, V.; KAMBOJ, S.; MAGGON, N. Transdermal drug delivery systems: approaches and advancements in drug absorption through skin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Raipur, v. 20, n. 1, p. 47-56, 2013.

KANEBAKO, M.; INAGI, T.; TAKAYAMA, K. Evaluation of skin barrier function using direct current I: effects of conductivity, voltage, distance between electrodes and electrode area. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 11, p. 1456-1460, 2002.

KANG, M. J.; EUM, J. A.; PARK, S. H.; KANG, M. H.; PARK, K. H.; CHOI, S. E.; LEE, M. W.; KANG, K. H.; OH, C. H.; CHOI, Y. K. Pep-1 peptide-conjugated elastic liposomal formulation of taxifolin glycoside for the treatment of atopic dermatitis in NC/Nga mice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 402, n. 1 -2, p. 198- 204, 2010.

KERSAWANI, K.; GUPTA, R.; MUKERJEE, A. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Lucknow, v. 3, n. 4, p. 253-266, 2013.

KIM, J. K.; LEE, O. S.; HA, J. H.; PARK, G.; KIM, J. K.; OH, C. H. *In vivo* assessment of the effect of taxifolin glycoside on atopic dermatitis-like skin lesions using biomedical tools in NC/Nga mice. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 547-555, 2015. KLEIN, R. R.; HECKART, J. L.; THAKKER, K. D. In vitro release testing methodology and variability with the vertical diffusion cell (VDC). **Dissolution Technologies**, Washington, v. 25, n. 3, p. 52-61, 2018.

KNOOR, F.; LADMANN, J.; PATZELT, A.; STERRY, W.; BLUME-PAYTAVI, U.; VOGT, A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 71, n. 2, p. 173-180, 2009.

KOCÁBOVÁ, J.; FIEDLER, J.; DEGANI, I.; SOKOLOVÁ, R. Oxidation mechanism of flavanone taxifolin. Electrochemical and spectroelectrochemical investigation. **Electrochimica Acta**, New York, v. 187, n. 1, p. 358-363, 2016.

KRUGER, A.; GANZERA, M. *Oroxylum indicum* seeds – Analysis of flavonoids by HPLC–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 70, n. 4, p. 553-556, 2012.

KUMAR, B.; JAIN, S. K.; PRAJAPATI, S. K. Effect of penetration enhancer DMSO on in vitro skin permeation of acyclovir transdermal microemulsion formulation. **International Journal of Drug Delivery**, [S.I.], v. 3, n. 1, p. 83-94, 2011.

KUSPRADINI, H.; MITSUNAGA, T.; OHASHI, H. Antimicrobial activity against *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase inhibitory activity of taxifolin and some flavanonol rhamnosides from kempas (*Koompassia malaccensis*) extracts. **Journal of Wood Science**, [S.I.], v. 55, n. 4, p. 308–313, 2009.

LAKSHMI, P. K.; SAMRATHA, K.; PRASANTHI, B.; VEERESH, A. C. Oils as penetration enhancers for improved transdermal drug delivery: a review. **International Research Journal of Pharmacy**, Rampur, v. 8, n. 4, p. 9-17, 2017.

LEE, C. W.; PARK, N. H.; KIM, J. W.; UM, B. H.; SHPATOV, A. V.; SHULTS, E. E.; SOROKINA, I. V.; POPOV, S. A. Study of skin anti-ageing and anti-inflammatory effects of dihydroquercetin, natural triterpenoids, and their synthetic derivatives. **Bioorganicheskaja Khimiia**, [S.I.], v. 38, n. 3, p. 374-381, 2012.

LIANG, L.; GAO, C.; LUO, M.; WANG, W.; ZHAO, C.; ZU, Y.; EFFERTH, T.; FU, Y. Dihydroquercetin (DHQ) induced HO-1 and NQO1 expression against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 11, p. 2755-2761, 2013.

LIU, X., TESTA, B. FAHR, A. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. **Pharmaceutical research**, New York, v. 28, n. 5, p. 962-977, 2011.

MA, C.; YANG, L.; WANG, W.; YANG, F.; ZHAO, C.; ZU, Y. Extraction of dihydroquercetin from *Larix gmelinii* with ultrasound-assisted and microwave-assisted alternant digestion. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 7, p. 8789-8804, 2012.

MANIGANDAN, K.; JAYARAJ, R. L.; ELANGO VAN, N. Taxifolin ameliorates 1, 2-dimethylhydrazine induced cell proliferation and redox avulsions in mice colon carcinogenesis. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 499-509, 2014.

MISHRA, S.; SINGH, S.; MISRA, K. Restraining Pathogenicity in *Candida albicans* by Taxifolin as an Inhibitor of Ras1-pka Pathway. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 182, n. 11-12, p. 953-965, 2017.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Database**: Compound Summary for CID 439533. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439533>. Acesso em: 02 out. 2017.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Guidance document for the conduct of skin absorption studies**. Paris: OECD, 2011. 72 p. Disponível em: < <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf> >. Acesso em: 14 out. 2018.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development . . **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris: OECD, 2004, 8p. Disponível em: < <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071087-en.pdf?expires=1539545635&id=id&accname=guest&checksum=CA548B5146E917FDF9CEDE53050237D4>>. Acesso em: 14 out. 2018.

OI, N.; CHEN, H.; KIM, M. O.; LUBET, R. A.; BODE, A. M.; DONG, Z. Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 9, p. 1103-1114, 2012.

PEREIRA, R. O.; SILVA, T. C. C. P.; FERREIRA, A. O. BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B.; POLONINI, H. C. *Ex vivo* Skin Permeation Evaluation of an Innovative Transdermal Vehicle Using Nimesulide and Piroxicam as Model Drugs. **Current Drug Delivery**, Beijing, v.14, n. 4, p. 516-520, 2017.

POLONINI, H. C. **Permeação transdérmica de formulações tópicas contendo hormônios sexuais e ecotoxicidade aquática de micro e nanopartículas de titanato de bário**. 2014. Tese (Doutorado em Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

POLONINI, H.C.; SOLDATI, P.P.; OLIVEIRA, M.A.L. de; BRANDÃO, M.A.F.; CHAVES, M. das G.M.; RAPOSO, N.R.B. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 720-727, 2014.

RAMESH, S.; VELRAJ, M. An overview on novel approach of transdermal drug delivery systems. **Drug Invention Today**, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 297-303, 2018.

RAMTEKE, K. H.; DHOLE, S. N.; PATIL, S. V. Transdermal drug delivery system: a review. **Journal of Advanced Scientific Research**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 22-35, 2012.

RAZA, R.; MITTAL, A.; KUMAR, P.; ALAM, S.; PRAKASH, S.; CHAUHAN, N. Approaches and evaluation of transdermal drug delivery system. **International Journal of Drug Development and Research**, London, v. 7, n. 1, p. 222-233, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771 -780, 2004.

ROGGIA, I. **Avaliação da Estabilidade, Liberação e Permeação Cutânea de Nanocápsulas Contendo Benzofenona-3**. 2009. Dissertação (Mestrado em Nanociência) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

ROGOVSKII, V. S.; MATIUSHIN, A. I.; SHIMANOVSKII, N. L.; SEMEIKIN, A. V.; KUKHAREVA, T. S.; KOROTEEV, A. M.; KOROTEEV, M. P.; NIFANT'EV, E. E. Antiproliferative and antioxidant activity of new dihydroquercetin derivatives. **Ekspiermental'naia I Klinicheskaia Farmakologija**, [S.l.], v. 73, n. 9, p. 39-42, 2010.

ROGOZHIN, V. V.; PERETOLCHIN, D. V. Kinetic regulation of dihydroquercetin oxidation with horseradish peroxide. **Bioorganicheskaia Khimiia**, Moscou, v. 35, n. 5, p. 576–580, 2009.

SAHU, M.; BHOWMICK, M.; KUSHWAHA, R.; RATHI, J. Medicated transdermal therapeutic systems: na updated overview. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, [S.l.], v. 7, n.1, p. 43-49, 2017.

SHARMA, A.; SAINI, S.; RANA, A. C. Transdermal drug delivery system: a review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 286-292, 2013.

SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MIROSHNYK, I.; MIRZA, S.; URAKOVA, I. N.; HIRSJÄRVI, S.; MAKAROV, V. G.; HEINÄMÄKI, J.; YLIRUUSI, J.; HITUNEN, R. Nanodispersions of taxifolin: impact of solid-state properties on dissolution behaviour. **Pharmaceutical Nanotechnology**, [S.l.], v. 377, n. 1-2, p. 148-152, 2009.

SHUBINA, V. S.; SHATALIN, Y. V. Skin regeneration after chemical burn under the effect of taxifolin-based preparations. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 154, n. 1, p. 152-157, 2012.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SUN, X.; CHEN, R. C.; YANG, Z. H.; SUN, G. B.; WANG, M.; MA, X. J.; YANG, L. J.; SUN, X. B. Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy in vivo and in vitro by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 221-232, 2014.

TANWAR, H.; SACHDEVA, R. Transdermal drug delivery system: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Panchkula, v. 7, n. 6, p. 2274-2290, 2016.

USP – The United States Pharmacopeia. 37. ed. Rockville : United States Pharmacopeial Convention, 2014.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L.; QUEVEDO, A.E.P. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; FILHO, V.C. (Org.). **Químico de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 163-188.

VILLA, D. D. **Avaliação da quantidade e uniformidade do filtro solar quando aplicado na pele de adolescentes e adultos jovens após aplicação simples e reaplicação, através da técnica de *tape-stripping***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

WALLACE, S. N.; CARRIER, D. J.; CLAUSEN, E. C. Batch solvent extraction of flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 16, n. 1, p. 7-16, 2005.

WEIDMANN, A. E. Dihydroquercetin: More than just an impurity? **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 684, n. 1-3, p. 19-26, 2012.

WESTER, R. C.; CHRISTOFFEL, J.; HARTWAY, T.; POBLETE, N.; MAIBACH, H. I.; FORSELL, J. Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: Storage and detrimental effects of heat-separation and freezing. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 15, n. 1, p. 82-84, 1998.

YANG, L.-J.; CHEN, W.; MA, S.-X.; GAO, Y.-T.; HUANG, R.; YAN, S.-J.; LIN, J. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 85, n. 3, p. 629-637, 2011.

ZHANG, Z. R.; ZAHARNA, M. A.; WONG, M. M.; CHIU, S. K.; CHEUNG, H. Y. Taxifolin enhances andrographolide-induced mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer cells via spindle assembly checkpoint activation. **Plus One**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-15, 2013.

ZINCHENKO, V. P.; KIM I. A.; TARAKHOVSKII I. S.; BRONNIKOV, G. E. Biological activity of water-soluble nanostructures of dihydroquercetin with cyclodextrins. **Biofizika**, Moscow, v. 56, n. 3, p. 433-438, 2011.

ZU, Y.; WU, W.; ZHAO, X.; LI, Y.; WANG, W.; ZHONG, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, X. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 471, n. 1-2, p. 366-376, 2014a.

_____; _____; _____; _____; ZHONG, C.; ZHANG, Y. The high water solubility of inclusion complex of taxifolin- γ -CD prepared and characterized by the emulsion solvent evaporation and the freeze drying combination method. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 477, n. 1-2, p. 148-158, 2014b.

ZUCOLOTTO, S.A.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from south american *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 23, n. 3, p. 232-239, 2012.

ANEXO A

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Drug Delivery, 2018, 15, 000-000

1

RESEARCH ARTICLE

Taxifolin: Evaluation Through *Ex vivo* Permeations on Human Skin and Porcine Vaginal Mucosa

Michele Campos Alves^a, Priscila Aparecida de Almeida^a, Hudson Caetano Polonini^{b,c}, Carla Aparecida Pereira Bhering^a, Anderson de Oliveira Ferreira^c, Marcos Antônio Fernandes Brandão^a and Nádia Rezende Barbosa Raposo^{a,*}

^aNúcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil; ^bSuprema - Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil; ^cOrtofarma, Laboratório de Controle de Qualidade, Matias Barbosa, Brazil

Abstract: Background: Taxifolin (TAX) is a flavonoid that has numerous pharmacological properties, including an antioxidant ability superior to that of other flavonoids due to its particular structure. Nevertheless, it has low oral bioavailability, which limits its therapeutic application. In this context, potentially important approaches for systemic drug delivery could be by alternative routes such as skin and vaginal mucosa, once both routes have a variety of advantages compared with the oral route, including the ability to bypass both first-pass hepatic metabolism and the consequent degradation in the gastrointestinal tract. Vaginal delivery could also account for a local effect, or an effect on circumvent microregion.

Objective: The major objective of this study was to develop and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of TAX in a semisolid dosage forms and then to evaluate *ex vivo* permeations across porcine vaginal mucosa and human skin.

Method: TAX was incorporated into an oil-in-water emulsion developed previously by our group. Method for quantification was developed and validated using HPLC. Permeation through human skin and vaginal porcine mucosa were conducted in Franz-type cells.

Results: The method was precise (CV < 5%), accurate (recovery between 98% and 102%), linear ($R^2 > 0.99$), specific, and robust. Permeation experiments through porcine vaginal mucosa and human skin presented permeated percentages equal to 87.43% and 48.09% (per dose), respectively.

Conclusion: The results suggest that, in the matrixes studied, TAX may be able to exert its biological activities systemically when applied by these routes. Furthermore, it exhibits greater permeability potential when administered by intravaginal route.

Keywords: *Ex vivo* permeation, intravaginal route, semisolid dosage forms, taxifolin, transdermal route, validation studies

1. INTRODUCTION

Taxifolin (TAX), also known as dihydroquercetin (Fig. 1), is a flavanoid [1] widely distributed in barks of the genus *Pinus* and *Larix* and in the seeds of the genus *Silybum* [2]. It has also been found in onions [3], milk thistle [4] and fruits, especially grapes, oranges and grapefruit [5].

Numerous studies have shown that TAX possesses a wide range of pharmacological properties, including anticarcinogenic [6,7], anti-inflammatory [8,9], antioxidative [10-12],

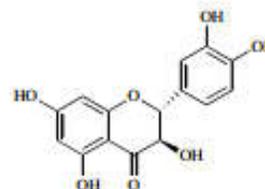


Fig. (1). Chemical structure of taxifolin.

and cardioprotective activities [13, 14]. However, it is only slightly soluble in water and consequently shows a slow dissolution rate from solid oral dosage forms [15]. This limits its bioavailability and restricts its therapeutic application [2,

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil; Tel/Fax: +55 32 21023809; E-mail: nadacrin@gmail.com

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do fluxo de permeação cutânea de fármacos administrados por via transdérmica

Pesquisador: NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01147112.5.0000.5147

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia (UFJF)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 151.275

Data da Relatoria: 22/11/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto possui pertinência e valor científico.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão claros e são passíveis de serem executados.

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios estão bem caracterizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem valor acadêmico e científico e foi bem estruturada na sua metodologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta o termo de responsabilidade com os gastos do estudo.

Recomendações:

Rever o cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atender o item recomendado.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto.

JUIZ DE FORA, 22 de Novembro de 2012

Assinador por:
Paulo Cortes Gago
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA VIABILIDADE DE ADMINISTRAÇÃO INTRAVAGINAL DE INGREDIENTES FARMACÊUTICOS ATIVOS PARA REDUZIR A DOR PÉLVICA RELACIONADA À ENDOMETRIOSE

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma condição inflamatória causada pela produção desregulada de estrogênio no tecido endometriótico ectópico e nas lesões endometrióticas. Essa condição leva a uma superprodução de prostaglandinas locais, fato que amplia o ambiente inflamatório (BULUN et al., 2015). A dor pélvica associada à endometriose (DPAE) representa um dos principais problemas clínicos da doença, afetando aproximadamente 80 % das mulheres acometidas (MARTINEZ et al., 2013; BULLETTI et al., 2010). Esta condição pode causar distúrbios psicológicos e afetar a qualidade de vida das mulheres que apresentam os sintomas (FACCHIN et al., 2015; CULLEY et al., 2013).

Uma abordagem importante para o tratamento da endometriose é o alívio da DPAE (SOARES et al., 2012). O tratamento farmacológico é baseado no uso de substâncias esteroidais que diminuem a dominância estrogênica como, por exemplo, dienogeste (DNG) e gestrinona (GTN) e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) para reduzir a inflamação, como a nimesulida (NMS) e o piroxicam (PRX). Apesar de todos esses medicamentos estarem disponíveis e serem predominantemente recomendados por via oral, esta pode ser uma forma não conveniente de administração para uma ampla gama de pacientes (BOURDON et al., 2016). Além disso, os pacientes que fazem o uso de GTN por via oral sofrem de efeitos adversos androgênicos (MAIA et al., 2015); DNG oral pode causar precordialgia, náusea e irritabilidade (PETRAGLIA et al., 2012); e o uso de AINEs orais está associado a maior risco de problemas estomacais como náusea ou outros efeitos colaterais como a toxicidade hepática, renal e gastrointestinal (BROWN et al., 2017). Dentro deste contexto, o desenvolvimento de formulações em vias não orais simples poderia melhorar a qualidade de vida do paciente e fornecer certas vantagens sobre outros tratamentos (BOURDON et al., 2016; MAIA et al., 2015).

A administração desses fármacos na mucosa vaginal pode ser promissora para o tratamento da DPAE. Esta via possui vantagens devido à presença de uma elevada área de superfície, com uma rede densa de vasos sanguíneos. Além disso, os efeitos adversos causados pela absorção gastrointestinal e o metabolismo de primeira passagem pelo fígado são evitados (SRIKRISHNA, CARDOZO, 2013).

Atualmente, ainda não existe um sistema de liberação intravaginal comercial contendo DNG, GTN, NMS ou PRX para o tratamento da DPAE. Contudo, existem estudos para a GTN em que rotas não-orais foram desenvolvidas, como implantes subdérmicos (COUTINHO; AZADIAN-BOULANGER, 1988) ou cremes vaginais não industriais (BOURDON et al., 2016). Um estudo clínico de Maia e colaboradores (2015) avaliou o uso do creme vaginal de GTN em associação com o uso oral do extrato de *Pinus pinaster* e resveratrol e comprovou a eficácia dessa associação no tratamento da DPAE.

Além da falta de cremes intravaginais comerciais contendo DNG, GTN, NMS e PRX, o desenvolvimento de veículos semissólidos é demorado devido a diversos parâmetros que podem afetar a permeabilidade do fármaco através da membrana mucosa. Ao considerar a sua composição para os processos farmacêuticos, a mesma precisa ser de baixo custo e de fácil acesso (MAIA et al., 2015). Desta forma, encontramos alguns excipientes para a permeação como o Pentravan[®] (Fagron, Brasil), disponível no mercado. Trata-se de uma emulsão óleo em água com tecnologia lipossomal que possui vantagens como estabilidade física e maior capacidade para carregamento de fármacos (KIRILOV et al., 2016). Foi desenvolvido inicialmente para aplicações transdérmicas, incluindo substâncias não esteroidais (ALMEIDA et al., 2015; POLONINI et al., 2014). Recentemente, tem sido avaliado para a liberação vaginal de substâncias como o resveratrol (POLONINI et al., 2015), o danazol (MAIA; HADDAD; CASOY, 2014) e a própria GTN (estudo clínico) (MAIA et al., 2015). Entretanto, nenhum artigo avalia a permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX combinada com Pentravan[®] para o tratamento da DPAE.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade de se usar a administração intravaginal de DNG, GTN, NMS e PRX em pacientes com DPAE. Para este propósito, metodologias analíticas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) foram validadas para a quantificação dos princípios ativos. Além disso, ensaios de permeação foram realizados em mucosa suína através de modelo *ex vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endometriose

A endometriose é caracterizada pela presença de endométrio fora da cavidade uterina, o que induz a uma reação inflamatória crônica. Essa resposta é acompanhada por angiogênese, infiltração nervosa, adesão, fibrose e distorção da anatomia pélvica (GIUDICE, 2010). As localizações mais comuns do tecido endometriótico ectópico são na cavidade pélvica (peritônio, ovários, intestino, bexiga e septo retovaginal) e, em casos raros, no diafragma, na pleura e no pericárdio (PAVONE; LYTTLE, 2015).

A etiopatogenia ainda não está bem estabelecida. Existem algumas hipóteses sobre como as lesões endometrióticas se desenvolvem. A teoria da menstruação retrógrada (Figura 1) foi estabelecida em 1927 e foi reconhecida como teoria de Sampson. Nesta, o refluxo do tecido endometrial ocorre através das trompas de falópio, durante a menstruação, com subsequente implantação e crescimento desse tecido na cavidade pélvica (GONÇALVES, 2016). Esses fragmentos endometriais também podem ser disseminados para outros locais ectópicos através da circulação hematogênica ou linfática (PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017).

A menstruação retrógrada é um fator comum entre mulheres no período menstrual, entretanto, o aparecimento da endometriose não é evidenciado em todos os casos. Dessa forma, a diferença entre mulheres com e sem a doença pode estar relacionada a taxas variáveis de implantação de células endometriais e não à ocorrência da menstruação retrógrada em si. A persistência dessas lesões e a proliferação e manutenção dessas células depositadas na cavidade pélvica podem ser influenciadas pelo ambiente hormonal, inflamatório ou imunológico (PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017).

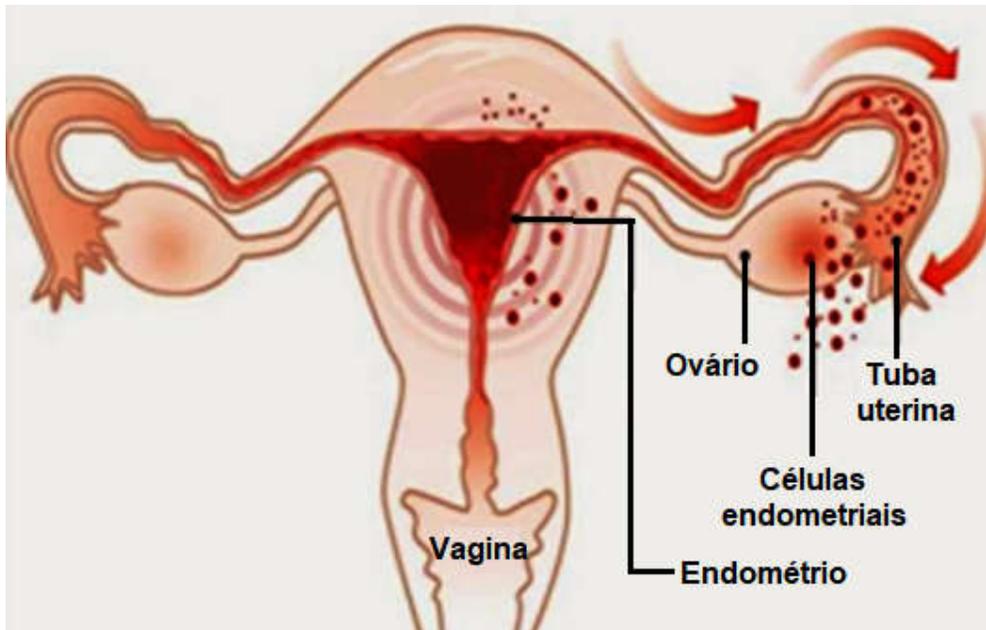


Figura 1. Teoria da menstruação retrógrada: refluxo do tecido endometrial através das trompas de falópio durante a menstruação.
Fonte: TONSA, 2018.

A associação entre a endometriose e a idade da menarca e o uso de contraceptivos orais sugerem uma associação hormonal à prevalência da doença em mulheres em idade reprodutiva. Esta teoria não é independente da teoria da menstruação retrógrada, já que os níveis hormonais podem influenciar o volume do fluxo menstrual ou promover a sobrevivência de implantes endometriais fora do útero. Além disso, mulheres com o sistema imunológico comprometido podem ter mais placas endometriais fora do útero do que mulheres com a função imune normal (FARLAND et al., 2017).

Alternativamente, a etiologia da endometriose encontra-se ligada à influência de fatores genéticos. Estes contribuem com cerca de metade da variação no risco de endometriose, com uma estimativa de hereditariedade de 51 %. O gene WNT4, por exemplo, é um marcador de interesse em estudos genômicos. O mesmo é importante para o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e para a esteroidogênese (VERCELLINI et al., 2014). Outra variação genética associada ao risco de endometriose está presente no cromossomo 2q13. Este reside em uma região rica em genes inflamatórios e a expressão alterada desses genes pode alterar a regulação de proteínas inflamatórias. Estas variações genéticas podem interferir na resposta inflamatória presente no ambiente peritoneal, condição que facilita a progressão das lesões endometriais (GAJBHIYE et al., 2018).

Outra teoria aceita para a endometriose é a metaplasia celômica. Esta postula que a endometriose possui origem a partir da metaplasia de células especializadas que estão presentes no revestimento mesotelial do tecido visceral e do peritônio abdominal. Fatores hormonais ou imunológicos são capazes de estimular a transformação de células do tecido peritoneal em tecido semelhante ao endométrio (SOURIAL; TEMPEST; HAPANGAMA, 2014).

A incidência de endometriose em diferentes estudos varia entre 5-15 % em mulheres em idade reprodutiva e 2-5 % em mulheres na pós-menopausa, atingindo 40 a 50 % em mulheres inférteis e até 90 % das mulheres com dor pélvica (BELLELIS; PODGAEC; ABRAO, 2014). A endometriose pode ser classificada em quatro estádios: I-mínimo, II-leve, III-moderado e IV- grave. Esta classificação depende da localização, da extensão e da profundidade dos implantes endometriais, da presença e severidade de adesões, da presença e do tamanho dos endometriomas ováricos (GIULIANE et al., 2015).

A condição inflamatória presente na endometriose é causada pela produção desregulada de estrogênio no tecido endometriótico ectópico e nas lesões endometrióticas. O estímulo à síntese de estrogênio local amplia o ambiente inflamatório e leva a uma superprodução de prostaglandinas (BULUN et al., 2015). Esta reação inflamatória crônica resulta no aparecimento da dor pélvica. Esta pode ser cíclica ou crônica, sendo a última definida como uma dor pélvica não menstrual com duração superior a seis meses e com intensidade capaz de causar incapacidade funcional ou requerer tratamento clínico ou cirúrgico (MARTINEZ et al., 2013). A DPAE afeta aproximadamente 80 % das mulheres com endometriose (BULLETTI et al., 2010). Pesquisadores demonstraram que mulheres que sofrem de DPAE podem ter maior distúrbio psicológico e pior saúde mental e qualidade de vida do que as mulheres com endometriose assintomática ou sem endometriose (FACCHIN et al., 2016; FACCHIN et al., 2015;; POPE et al., 2015; CULLEY et al., 2013).

2.1.1 Diagnóstico

O quadro clínico da paciente com endometriose é variável. A paciente pode ser assintomática, apresentar infertilidade ou sintomas como dismenorreia severa, disporeunia profunda, dor pélvica crônica, dor ovulatória, disúria, disquezia e fadiga crônica (MORI et al., 2015; SCHRAGER; FALLERONI; EDGOOSE, 2013). Uma vez que os sintomas são inespecíficos, o diagnóstico da doença é difícil e tardio. O diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela anamnese completa da paciente através da análise do histórico familiar, dos sintomas e de exames físicos e a partir de técnicas de imagem como a ecografia pélvica transvaginal e abdominal e a ressonância magnética. Entretanto, o diagnóstico definitivo é realizado pela associação entre a laparoscopia e a confirmação histopatológica (DUNSELMAN et al., 2014).

2.1.2 Tratamento

O tratamento da endometriose tem como um dos seus principais objetivos o alívio das queixas e dos sintomas. O alívio da DPAE e a recuperação da fertilidade é realizado por meio de medicamentos e/ou cirurgia. O tratamento farmacológico é baseado no uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), danazol, contraceptivos orais (combinados ou não) e análogos do hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH) e os progestágenos (SOARES et al., 2012).

Os AINES atuam inibindo a ciclo-oxigenase e diminuindo a produção de prostaglandinas no tecido. Dessa forma, reduzem o tônus uterino e as cólicas decorrentes do espasmo da musculatura lisa uterina (DARDES; MORAES; SANTOS, 2011). O danazol é um androgênio derivado da 17-etiniltosterona que suprime as gonadotropinas e age inibindo a ovulação (GONÇALVES, 2016).

Os anticoncepcionais orais, quando usados de maneira contínua, agem inibindo a ovulação e reduzindo a proliferação endometrial, limitando a produção de prostaglandinas. Os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proporcionam um mecanismo de retroalimentação negativo na hipófise, inibindo a

síntese e a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH). Desta forma, esses análogos geram a amenorreia e a anovulação e induzem a um estado de baixos níveis de estrogênio, protegendo a paciente de um novo episódio de endometriose (CARVALHO et al., 2016).

Os progestágenos sintéticos possuem efeito antimitótico dos progestativos e induzem a decidualização do endométrio eutópico bem como do endométrio em localização ectópica, com consequente atrofia das lesões de endometriose (RUHLAND et al., 2011; KAPPOU; MATALLIOTAKIS; MATALLIOTAKIS, 2010). As indicações terapêuticas dos progestativos englobam o controle da dor, a redução do tamanho das lesões e a diminuição das recorrências pós-cirúrgicas (SOARES et al., 2012).

2.1.2.1 Fármacos selecionados para o estudo

2.1.3.1 Dienogeste

O DNG (Figura 2) está disponível no mercado nacional [Allurene(Bayer, Brasil)] e foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e reconhecido como fármaco eficaz para o tratamento da endometriose. É derivado da C-19-noresterona e possui afinidade por receptores de progesterona. Este progestogênio cria um ambiente endócrino hipoestrogênico e hiperprogestogênico que, inicialmente, causa a decidualização do tecido endometrial ectópico e a atrofia das lesões com o tratamento continuado (SUGIMOTO et al., 2015).

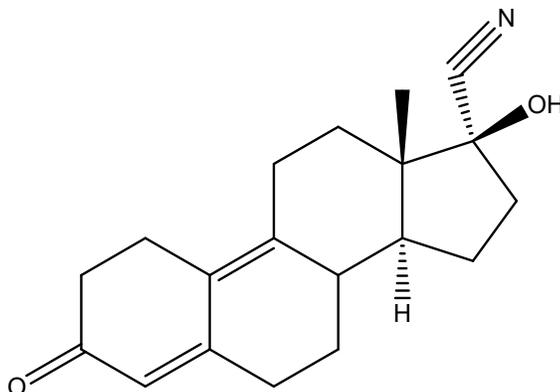


Figura 2. Estrutura química de dienogeste.

A dose recomendada de DNG por via oral é de 2 mg, uma vez ao dia. Embora esta dosagem seja capaz de induzir um estado anovulatório, a sua eficácia contraceptiva não foi avaliada. Portanto, recomenda-se a utilização de métodos contraceptivos não hormonais durante a duração da terapia com DNG. O fármaco é rapidamente absorvido por esta via e apresenta biodisponibilidade quase completa após a sua administração (MCCORMACK, 2010). Apresenta meia-vida de aproximadamente 10 horas e distribuição sistêmica ligada à albumina. O seu metabolismo é realizado principalmente pela enzima do citocromo P450 (CYP) CYP3A4, forma metabólitos endocrinologicamente inativos e é excretado predominantemente na urina. Em relação aos efeitos adversos, o principal é o sangramento vaginal irregular que parece ser minimizado com a persistência do tratamento (PINTO, 2016). Outras reações mais comuns são: cefaleia, náusea, precordialgia, humor deprimido e acne (PETRAGLIA et al., 2012).

2.1.3.2 Gestrinona

A GTN (Figura 3) é um hormônio esteróide sintético derivado da 19-nortestosterona. Foi originalmente desenvolvida como um contraceptivo oral para mulheres e não apresenta vantagens significativas em relação a outros anticoncepcionais. Devido aos seus efeitos anabólicos, é o único progestogênio

comercializado incluído na lista proibida de fármacos para melhorar o desempenho no esporte (BRUN et al., 2010).

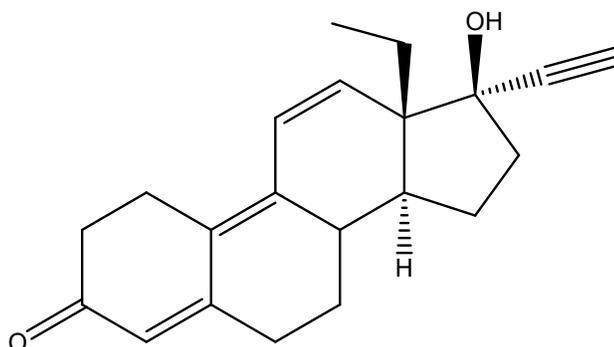


Figura 3. Estrutura química de gestrinona.

Atualmente, a GTN é utilizada no tratamento da endometriose. Esta é capaz de reduzir a concentração plasmática de globulinas de ligação de hormônios sexuais e pode ser considerada como androgênica, antiprogestogênica e antiestrogênica. A administração é realizada por via oral, semanalmente (uma a quatro vezes), na dose de 2,5 a 10 mg. O efeito clínico é obtido pela supressão da ovulação, que leva a amenorreia ou oligomenorreia. A GTN mostra-se bastante efetiva no tratamento da endometriose, quando administrada por mais de 6 meses. Entretanto, 57 % dos pacientes apresentam recorrência dos sintomas após 12 meses do tratamento. A regressão é observada, mas não há o desaparecimento dos focos endometrióticos (GONÇALVES, 2016).

A GTN possui um tempo de meia-vida de aproximadamente 28 h quando ingerido oralmente, sendo metabolizada pelo fígado e excretado pela urina e pelas fezes. Seus efeitos adversos apresentam baixa tolerabilidade e são representados por: seborréia, acne, ganho de peso, hipotrofia mamária, alteração da voz e aumento do colesterol e de triglicerídeos (MAIA et al., 2015).

2.1.3.3 Nimesulida

A NMS (Figura 4) é um AINE pertencente à classe das sulfonamidas. A presença de um grupamento sulfonamida em sua estrutura favorece para que o

fármaco seja um inibidor mais seletivo para a ciclo-oxigenase do tipo 2 (COX-2) do que para a ciclo-oxigenase do tipo 1 (COX-1) e apresente características anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (HUERTA; ABERTURAS; MOLPECERES, 2015).

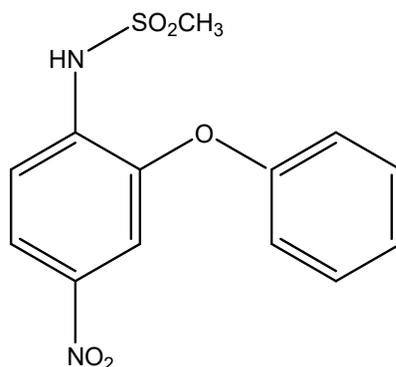


Figura 4. Estrutura química de nimesulida.

A NMS é bem absorvida quando administrada por via oral e a presença de alimentos no estômago não reduz a sua taxa de absorção. Possui um tempo de meia-vida de 3 a 6 horas, sendo biotransformada no fígado, através das enzimas do citocromo P450, em que a CYP2C9 e CYP2C19 estão envolvidas nas reações de hidroxilação. O seu metabólito principal é a 4-hidroxinimesulida, que é ainda ativo farmacologicamente. Aproximadamente 98 % do fármaco é excretado na urina, num período de 24 h (CUNHA, 2017).

Assim como os demais AINEs, o uso oral da NMS pode causar efeitos adversos como a toxicidade hepática, renal e gastrointestinal e problema estomacal como a náusea (BROWN et al., 2017).

2.1.3.4 Piroxicam

O PRX (Figura 5) é classificado como um AINE e possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. Age inibindo reversivelmente as enzimas COX-1 e COX-2, de forma não seletiva. É prescrito para o tratamento de diversas

doenças, tais como artrite reumatóide, osteoartrite, distúrbios musculoesqueléticos, gota, dismenorréia primária e endometriose (SANTOS et al., 2011).

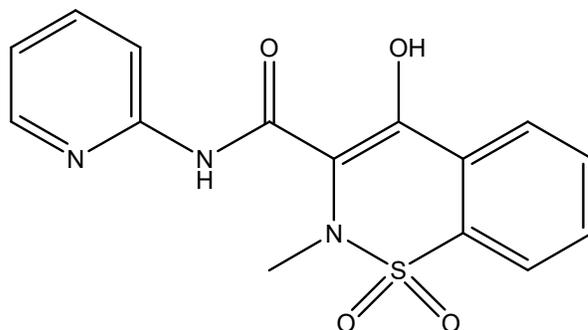


Figura 5. Estrutura química de piroxicam.

Segundo a ANVISA, os medicamentos referência do PRX presentes no mercado brasileiro são o Feldene[®], produzido pela Pfizer, e o Floxicam[®], produzido pela Neoquímica. O primeiro é comercializado nas formas farmacêuticas cápsula, comprimidos, supositórios, solução injetável e gel. O Floxicam[®], por sua vez, está disponível apenas em cápsula (BRASIL, 2011).

O PRX é classificado como um fármaco de classe II, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico. Dessa forma, apresenta baixa solubilidade em pH fisiológico e alta permeabilidade pela membrana intestinal. Por apresentar baixa solubilidade em pH fisiológico, quando administrado por via oral, possui absorção lenta e irregular e demora de três a cinco horas após a sua administração para alcançar níveis plasmáticos máximos (PEREIRA, 2012).

A dose diária habitual de PRX varia entre 10 e 20 mg, mas a dose diária máxima é de 20 mg. Apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas (99 %) e uma longa meia-vida de eliminação, com média de 50 h (FDA, 2018). É metabolizado pela CYP2C9, enzima responsável pela formação do seu principal metabólito, o 5'-hidroxi-piroxicam. Este é considerado inativo e é excretado na urina (predominantemente) e nas fezes (MOYSÉS, 2016).

Os efeitos adversos apresentados pelo PRX são dor e desconforto abdominal, estomatite, constipação, diarreia, anorexia, indigestão, sangramento gastrointestinal, úlcera, edema, pancreatite, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e fotossensibilidade (PEREIRA, 2012).

2.2 A mucosa vaginal como via de administração para fármacos

2.2.1 Anatomia, fisiologia e histologia da vagina

A vagina é o órgão genital feminino cujas funções estão relacionadas com a relação sexual, a concepção e a liberação da menstruação. É um órgão tubular, fibromuscular, que se estende desde o cérvix do útero até o vestíbulo vaginal, com dimensões variando de 8,4 a 11,3 cm de comprimento e 2,1 a 5,0 cm de diâmetro, localizada entre a bexiga e o reto (Figura 6) (PEREIRA; RUSCHI, 2012). A parede vaginal é formada por inúmeras pregas transversais, conferindo-lhe características distensíveis, além de aumentarem consideravelmente a área de superfície vaginal. Possui uma excelente elasticidade devido à presença de fibras elásticas lisas em sua musculatura. A sua irrigação sanguínea é realizada por ramos da artéria uterina, pela artéria vaginal e por ramos provenientes da artéria ilíaca interna (CARDOSO, 2013).

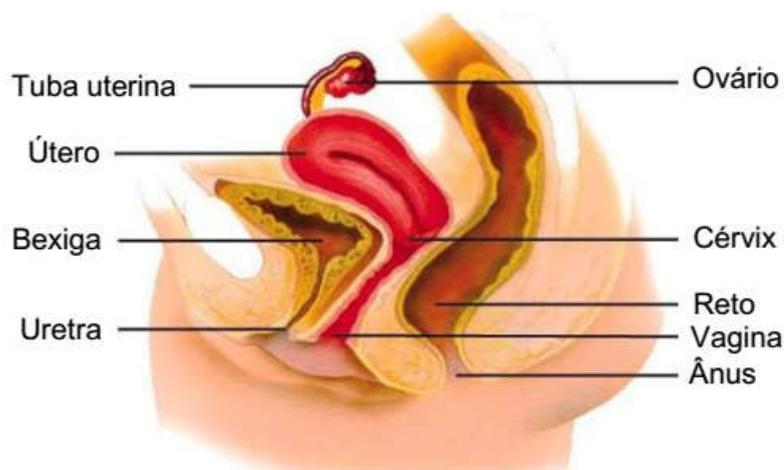


Figura 6. Sistema reprodutor feminino.

Fonte: ALMEIDA, 2015.

O tecido vaginal é composto por quatro camadas distintas: epitélio escamoso estratificado, lâmina própria, camada muscular e adventícia (Figura 7). A camada mais superficial é composta por um epitélio escamoso estratificado não

queratinizado, integrado por uma camada rica em glicogênio e outros tipos de células como os macrófagos e as células de Langerhans. Sua espessura varia de 150 a 200 μm , o que corresponde a 30-45 camadas de células não queratinizadas, que podem ser identificadas em cinco camadas diferentes: camada basal, parabasal, intermédia, transicional e superficial, intimamente unidas por desmossomas e *tight junctions* (proteínas transmembranares presentes no espaço intercelular). O epitélio escamoso encontra-se circundado por tecido conectivo, conhecido como lâmina própria, que desempenha um papel importante na sua manutenção e resposta a agressões. Esta camada é constituída de fibroblastos, fibras elásticas e colágenas, vasos, nervos e células de defesa. Logo abaixo, encontra-se a camada muscular, composta por fibras de músculo liso circular e longitudinal. E por fim, a túnica adventícia, formada por tecido conetivo, contendo um elevado suprimento sanguíneo, linfático e nervoso (MACHADO et al., 2015).

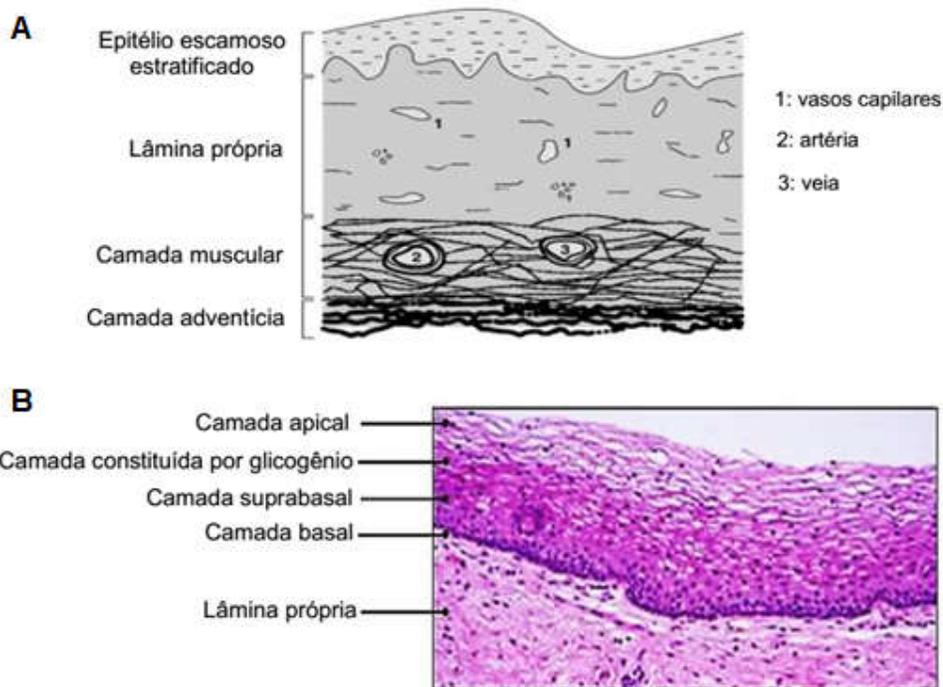


Figura 7. Mucosa vaginal humana. A. Esquema. B. Histologia (coloração por hematoxilina-eosina, aumento de 20x).

Fonte: adaptado de ALMEIDA, 2015.

Embora seja referida como um tecido mucoso, a vagina não possui glândulas secretoras. A superfície úmida deste tecido é composta por uma mistura de fluidos

provenientes de um número de fontes diferentes (VANIĆ; ŠKALKO-BASNET, 2013), principalmente das secreções glandulares do cérvix, da transudação vaginal, das glândulas de Bartholin e Skene, das células epiteliais esfoliadas e de urina residual. Neste sentido, o fluido vaginal é constituído por 90-95% de água, sais orgânicos e inorgânicos, ureia, glicerol, albumina, enzimas, leucócitos e detritos epiteliais. A produção diária normal corresponde a aproximadamente 6g/dia ou 0,5 a 0,75 mL (CARAMELLA et al., 2015). O muco cervical apresenta funções fisiológicas como manter a lubrificação e a hidratação do epitélio, servir como barreira em relação a agentes patogênicos e substâncias nocivas e permitir a troca de gases e nutrientes com epitélios adjacentes (PEREIRA; BRUSCHI, 2012).

O ambiente vaginal é caracterizado por um pH que varia entre os 3,5 – 4,5 durante a idade fértil de uma mulher saudável, mas pode variar ao longo dos diferentes estágios do ciclo menstrual e de acordo com a quantidade de muco cervical presente. A manutenção deste pH é realizada por espécies de *Lactobacillus* presentes na microbiota vaginal, uma vez que, transformam o glicogênio sintetizado pelas células epiteliais em ácido láctico). Esses micro-organismos possuem um papel importante na prevenção e no controle da proliferação de micro-organismos patogênicos, uma vez que aderem ao muco vaginal, formando uma barreira que previne a colonização por patógenos, competem por receptores nas células epiteliais e produzem compostos bactericidas como o peróxido de hidrogênio (CARAMELLA et al., 2015).

O ecossistema vaginal é complexo, sendo a composição do muco, a espessura do epitélio e o pH influenciados por fatores como a idade, os níveis hormonais, a gravidez e as alterações na microbiota (ANWAR; CAMARDA; KIEWEG, 2015).

2.2.2 A absorção de fármacos na mucosa vaginal

A absorção de fármacos na mucosa vaginal ocorre em duas etapas principais: dissolução do fármaco no fluido vaginal e penetração no epitélio (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013). O mecanismo de transporte da maioria das substâncias ativas absorvidas através da mucosa vaginal é a difusão passiva. Os compostos lipofílicos

atravessam a camada epitelial pela via intracelular, enquanto os hidrofílicos por via intercelular, ou através dos poros aquosos presentes na mucosa vaginal (NEVES; BAHIA, 2006).

2.2.3 Formulações de aplicação vaginal

A administração no canal vaginal é realizada por uma variedade de formas farmacêuticas, distribuídas na forma de materiais sólidos monolíticos como anéis intravaginais e materiais moles e semissólidos como géis, cremes, supositórios, filmes e comprimidos dissolvidos (KATZ; YUAN; GAO, 2015).

Os produtos vaginais comerciais e em desenvolvimento introduzem uma variedade de medicamentos destinados ao uso sistêmico (por exemplo, hormônios anticoncepcionais) (GIGLIO et al., 2017) e ao uso tópico (por exemplo, espermicidas, agentes contra infecções do trato urinário e infecções causadas por *Candida sp.* medicamentos para vaginose bacteriana, entre outros). Atualmente, existe muita atividade voltada para o desenvolvimento de produtos quimioterapêuticos (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015) e que fornecem medicamentos denominados microbicidas. Estes atuam topicamente no ambiente vaginal para inibir a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) transmitido sexualmente e/ou outros patógenos como o vírus do papiloma humano (HPV) e o vírus do herpes simplex (KATZ; YUAN; GAO, 2015).

A administração vaginal de fármacos possui vantagens devido à presença de uma elevada área de superfície, com uma rede densa de vasos sanguíneos. A via permite o uso de regimes de dosagem prolongada, doses diárias mais baixas e a liberação contínua do fármaco. Os intervalos prolongados entre as doses podem ser mais convenientes do que a ingestão oral diária e, conseqüentemente, pode melhorar a aderência do paciente ao tratamento. Além disso, evita a absorção gastrointestinal e o efeito de primeira passagem pelo fígado. Entretanto, algumas desvantagens devem ser consideradas, como: sensibilidade cultural, higiene pessoal, possível irritação local em alguns casos e influência da relação sexual. Além disso, a variabilidade na absorção do fármaco relacionada com o ciclo menstrual, a menopausa e a gravidez, pode limitar a utilização desta via.

Finalmente, uma barreira intransponível é que a especificidade de gênero restringe a administração ao sexo feminino (SRIKRISHNA, CARDOZO, 2013).

2.2.4 Fatores que afetam a permeabilidade vaginal

Alguns fatores associados à fisiologia vaginal e ao perfil da formulação podem influenciar na dissolução e na absorção do fármaco (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). Propriedades físico-químicas, tais como peso molecular, lipofilicidade, ionização, carga superficial e a natureza química podem influenciar na absorção do fármaco no epitélio vaginal (SARMENTO et al., 2012). Substâncias lipofílicas de baixo peso molecular são melhor absorvidas do que lipofílicas de alto peso molecular ou hidrofílicas. Entretanto, as mesmas devem conter um certo grau de hidrosolubilidade, uma vez que o líquido vaginal contém grande quantidade de água (HUSSAIN; AHSAN, 2005).

Quando a ação sistêmica de um medicamento é desejável, vários fatores fisiológicos devem ser levados em consideração. A idade é o melhor biomarcador das características da camada superficial do epitélio. Algumas mudanças na espessura do epitélio podem ocorrer com o tempo, assim como na junção das células e na composição e organização dos lipídeos no espaço intercelular. Essas características, assim como a concentração de enzimas e a produção do fluido vaginal, podem influenciar na permeabilidade do fármaco (MACHADO et al., 2015). O volume e a viscosidade dos fluidos vaginais também podem ser afetados pela idade, por mudanças hormonais e pela estimulação sexual. A absorção pode ser aumentada para fármacos pouco solúveis em água, quando o volume do fluido vaginal é maior. No entanto, a presença de muco cervical excessivamente viscoso pode remover o fármaco da cavidade vaginal. O pH do fluido também é um fator crítico uma vez que pode alterar o grau de ionização de ácidos e bases fracas (VANIĆ; ŠKALKO-BASNET, 2013).

Algumas estratégias tendem a aumentar a sua permeabilidade de fármacos vaginais, como a utilização de substâncias promotoras de permeação, modificadores da solubilidade e agentes mucoadesivos. Os promotores de permeação são capazes de diminuir a barreira de penetração, sendo representados por agentes tensoativos

não iônicos, sais biliares, cloreto de benzalcônio, ácido hialurônico, polietilenoglicol e etoxidiglicol. Os modificadores da solubilidade agem por adição de agentes solubilizantes como o ácido cítrico, o etilenodiaminotetraacetato, o metafosfato de sódio, a polivinilpirrolidona, o sorbitano, o Tween[®] 80, o polioxietileno, e a ciclodextrina. Os agentes mucoadesivos permitem um contato próximo da formulação com a superfície da mucosa vaginal, promovendo a aderência e a permanência contínua e prolongada da forma de dosagem no local de aplicação. Estes agentes podem ser representados por policarbofil, ácido hialurônico, quitosana, alginato de sódio, tragacanto, carbômero, acácia, carboximetilcelulose de sódio ou outros derivados de celulose, Carbopol[®] 974P-NF, Carbopol[®] 971P-NF e outros copolímeros do ácido acrílico (DOBARIA; MASHRU; VADIA, 2007).

Diversas outras técnicas podem ser utilizadas no intuito de bloquear os fatores que afetam a permeabilidade vaginal. Estas podem ser exemplificadas como: a administração de géis termossensíveis, incluindo a dispersão do medicamento no gel com uma concentração maior que o seu valor de solubilidade; as nanopartículas, os lipossomas e complexos de ciclodextrina carregados com fármaco disperso (PEREIRA; BRUSCHI, 2012).

2.3 Avaliação da qualidade de produtos vaginais na forma de dosagem semissólida

A *United States Pharmacopeia* (USP) define claramente que o desempenho de medicamentos de uso tópico, incluindo os produtos de administração vaginal, deve ser avaliado através do ensaio de liberação de fármaco *in vitro*. Esse ensaio deve ser realizado em sistemas de células de difusão vertical, que por sua simplicidade, podem fornecer medições confiáveis e reprodutíveis da liberação do fármaco a partir da formulação. As células de Franz representam um sistema de referência na metodologia da USP (MACHADO et al., 2015), sendo o seu funcionamento descrito no capítulo 1 deste trabalho.

Algumas considerações devem ser avaliadas para os sistemas de administração de fármacos vaginais. A temperatura fisiológica durante o ensaio deve ser mantida (37 ± 2 ° C) e os fluidos receptores devem ser selecionados para que

mimetizem as condições *in vivo*. Tampões de pH levemente ácido (tampões de fosfato ou acetato; pH 4,0-4,5) e simuladores de fluidos vaginais (pH 4,2) são comumente aplicados como meio de dissolução. Ocasionalmente, o meio pode ser constituído de tampões de pH ligeiramente superior, simulando condições patológicas (pH > 4,5) (JUG et al., 2018). Quando o composto ativo for insolúvel ou pouco solúvel em meio aquoso, pode ser necessário o acréscimo de surfactantes, agentes complexantes (como ciclodextrinas) ou solventes orgânicos ao meio de dissolução (OLEJNIK; GOSCIANSKA; NOWAK, 2012).

As recomendações da USP apontam para o uso de membranas sintéticas, inertes e altamente permeáveis durante os testes de liberação. Entretanto, o interesse em realizar estudos de permeabilidade utilizando membranas biológicas é evidente. Estas são mais semelhantes às condições *in vivo* e o seu uso pode fornecer informações sobre a biodisponibilidade do fármaco (KULKARNI et al., 2016). Para a estimativa da permeação do fármaco através do tecido vaginal, vários modelos podem ser utilizados, incluindo modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Devido às limitações e às questões éticas relacionadas ao manejo de animais, cultura de células e explantes de tecido são mais comumente utilizados nos ensaios (MACHADO et al., 2015).

O tecido humano não é utilizado como primeira escolha, uma vez que, só estaria disponível a partir de cadáveres, o que limitaria a permeação à medida que as células começassem a perder as suas características (ALVES et al., 2018). Entretanto, esta rota pode ser facilmente explorada pelo modelo porcino *ex vivo*, pois há uma excelente correlação de permeabilidade e resposta tecidual entre tecidos vaginais humanos e suínos, em termos de histologia, estrutura, composição e organização da barreira de permeabilidade (SQUIER et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a viabilidade da administração intravaginal de DNG, GTN, NMS e PRX em pacientes com DPAE.

3.2 Específicos

Inserir os fármacos avaliados em uma base comercial;

Validar métodos analíticos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação dos princípios ativos (PAs) nas formulações e nos ensaios realizados;

Estudar a solubilidade dos PAs em meio receptor Hank's;

Realizar o ensaio de permeação dos PAs em mucosa vaginal suína;

Calcular o balanço de massas do estudo, determinando a concentração de fármaco no meio receptor, no bastão de espalhamento e na mucosa vaginal;

Estudar a cinética de liberação dos fármacos, aplicando os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell;

Descrever os valores do fluxo em estado estacionário, o tempo de latência e o coeficiente de permeabilidade para cada fármaco;

Comparar o fluxo no estado estacionário com o fluxo alvo necessário para se obter uma resposta farmacológica;

Determinar a porcentagem permeada de cada fármaco, por dose aplicada, no período de 24h;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e padrões analíticos

No preparo da fase móvel para as análises por CLAE, foram empregados a acetonitrila e o metanol, todos de grau CLAE (Sigma, EUA). Para o preparo do meio receptor, foram utilizados: cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, hidrogenofosfato dissódico e D-glucose, todos de grau analítico, provenientes da empresa Sigma-aldrich (EUA). Água ultrapura, obtida de um sistema AquaMAX – Ultra 370 Series (Young Lin Instrument, Coréia do Sul), com resistividade em torno de 18,2 M Ω cm, foi utilizada durante as análises. DNG, GTN, NMS, PRX, etoxidiglicol e Pentravan[®] foram gentilmente doados pela Fagron (Brasil). Os padrões de referência utilizados foram da USP.

A fase móvel e o meio receptor foram filtrados à vácuo em membrana de filtro de fluoreto de polivinilideno (Sartorius, Alemanha) com porosidade de 0,45 μ m e degaseificados em banho de ultrassom (Cristófoli, Brasil) por 30 min antes do uso. Todas as soluções preparadas para o padrão e a amostra foram filtradas em membrana de celulose regenerada (Macherey-Nagel, Alemanha) de 0,45 μ m de porosidade e transferidas para frascos cromatográficos antes das injeções no sistema.

4.2 Manipulação das formas farmacêuticas

O teor de fármaco de cada formulação foi: DGN 0,2 % (m/m), GTN 0,5 % (m/m), NMS 2,0 % (m/m) e PRX 2,0 % (m/m). Cada ingrediente farmacêutico ativo foi exatamente pesado em balança analítica digital (AY220, Shimadzu, Japão), triturado e combinado com um máximo de 1,0 % de etoxidiglicol e, em seguida, Pentravan[®] foi adicionado geometricamente e misturado. Os produtos foram passados através de um moinho de rolo (Exakt 50, EUA), depois misturados pela

segunda vez, coletados e embalados em distribuidores opacos sem ar (Emphasys, Brasil). Todos os produtos foram armazenados à temperatura ambiente ao longo dos estudos.

4.3 Métodos analíticos por CLAE/UV

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatográfico qualificado e calibrado Agilent 1260 Infinity (EUA) composto por: bomba binária, detector de arranjo de fotodiodos (DAD), injetor automático, compartimento de coluna e *software* de controle. As condições cromatográficas utilizadas foram determinadas por prévios desenvolvimentos realizados pelo grupo de pesquisa e podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas nos métodos analíticos.

Fármaco	Coluna C18	Fase móvel	Fluxo (mL.min ⁻¹)	λ (nm)	Tempe- ratura(C)
DGN	150 x 4,6 mm, 5 μ m	H ₂ O: ACN 60:40 (v/v)	1,0	280	----
GTN	250 x 4,6 mm, 5 μ m	MeOH:H ₂ O: ACN 50:30:20 (v/v/v)	1,5	323	----
NMS	150 x 3,9 mm, 5 μ m	H ₂ O: ACN 50:50 (v/v)	1,8	220	----
PRX	150 x 4,6 mm, 5 μ m	Na ₂ HPO ₄ 0.05M pH3,5: H ₂ O: ACN 55:30:15 (v/v/v)	1,5	248	40

H₂O: água; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico; volume de injeção: 20 μ L; pré-coluna: C18, 4.0 x 3.0 mm, 5 μ m.

4.4 Validação dos métodos analíticos

Antes de serem utilizados em nosso estudo, os métodos foram validados conforme as diretrizes do INMETRO (2011) e a Resolução RDC nº 899 (BRASIL, 2003). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os passos anteriormente descritos na seção 4.4 do capítulo primeiro. Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

4.5 Estudo da solubilidade de DNG, GTN, NMS e PRX em meio receptor Hank's

O meio receptor utilizado para os ensaios de permeação foi uma solução de sal equilibrada de Hank's. Esta solução possui a seguinte composição: cloreto de cálcio ($0,1396 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de magnésio ($0,09767 \text{ g.L}^{-1}$), cloreto de potássio ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$), hidrogenofosfato de potássio ($0,06 \text{ g.L}^{-1}$), cloreto de sódio ($8,0 \text{ g.L}^{-1}$), hidrogenofosfato dissódico ($0,04788 \text{ g.L}^{-1}$) e D-glucose ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) (CARDOZO, 2013).

Para realizar o estudo da solubilidade de DNG, GTN, NMS e PRX, foram exatamente pesados 10 mg do princípio ativo em tubos de ensaio, onde 10 mL do meio receptor foi adicionado. Os tubos foram deixados em banho ultrassônico por 30 min e então incubados em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Nova Ética, Brasil) por 12 h. Posteriormente, eles foram centrifugados a $20.000 \times g$ (Excelsa Baby, Brasil), o sobrenadante diluído em uma proporção 0,5:10 (v/v), seguido por transferência para *vials* cromatográficos para a quantificação, segundo as condições do método desenvolvido para a formulação.

4.6 Preparo do tecido vaginal

Os tecidos vaginais suínos foram cedidos pelo matadouro municipal de Juiz de Fora. Foram recolhidos, inspecionados visualmente para a garantia de que estavam íntegros e inalterados pelas condições de remoção. O transporte do material foi realizado rapidamente em ambiente isotérmico a 4 °C. No laboratório, o isolamento inicial da mucosa foi realizado, limpando-se as vaginas e retirando a camada adiposa em excesso e o tecido conjuntivo com o auxílio de tesouras cirúrgicas e bisturi (Figura 8). As mucosas foram então lavadas em água purificada e solução salina, embrulhadas em Parafilm[®], envolvidas por papel alumínio e armazenadas a -80 °C antes do uso (não mais que 1 mês). Elas foram retiradas do congelador 30 min antes de serem usadas para descongelar, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram cortadas em forma de discos para serem encaixadas nas células de difusão vertical. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo nº 021/2014, Anexo B).



Figura 8. Mucosa vaginal utilizada nos ensaios de permeação.

4.7 Estudo de permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX

O ensaio de permeação *ex vivo* foi realizado em células de difusão vertical estáticas de 7 mL, com amostrador automático (Microette Plus[®], Hanson Research,

EUA). A câmara receptora foi preenchida com o meio receptor. Os discos de mucosa vaginal suína, após o descongelamento, foram posicionados entre o compartimento doador e a solução receptora, evitando-se sempre a formação de bolhas. Acima da mucosa foi colocado um anel de teflon (150 mm de diâmetro interno) e este teve o seu orifício totalmente preenchido pela emulsão ($n = 6$ para cada formulação). Uma dose finita da formulação (70 mg) foi aplicada com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva calibrada Pos-D MR-110 (Rainin, EUA) e foi distribuída uniformemente com um bastão de espalhamento de vidro sobre a superfície da membrana. O espalhador foi posteriormente rinsado com a fase móvel de cada método cromatográfico e a solução obtida foi analisada por CLAE para calcular a recuperação média do experimento. A área de difusão disponível foi de $1,86 \text{ cm}^2$. A formulação foi ocluída por disco de acrílico e o sistema foi fechado com uma garra metálica para evitar que o meio receptor evaporasse.

O meio foi mantido a temperatura de $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o experimento, sob agitação (600 rpm) por meio de uma barra de agitação magnética. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos regulares de tempos (1, 2, 4, 8, 16 e 24 h), recolhidas em *vials* cromatográficos e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas para cada método. Uma lavagem dos tubos de amostragem automática foi realizada com 1,5 mL do meio, 30 seg antes de cada coleta, e a agitação foi interrompida durante esta lavagem. As alíquotas retiradas foram repostas a cada coleta com meio receptor, à mesma temperatura, para manter o volume constante no interior das células. As concentrações correspondentes dos princípios ativos foram corrigidas para estabelecer a quantidade real de fármaco difundida no tempo t ($Q_{real,t}$). Essa correção foi realizada considerando a Equação 1:

$$Q_{real,t} = C_{calculada,t} \cdot V_r \cdot V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (1)$$

onde: $C_{calculada,t}$ é a concentração da amostra determinada no tempo t , V_r é o volume da célula de difusão, V_a é o volume da alíquota e C_a é a concentração da alíquota.

4.7.1 Modelização dos perfis de liberação

Quantidades cumulativas de GTN, DNG, NMS e PRX (μg) permeadas por unidade de área de superfície (cm^2) foram plotadas em função do tempo (h) para a determinação dos perfis de liberação. A partir destes perfis, quatro modelos matemáticos foram aplicados para determinar a cinética de liberação. As quantidades cumulativas de difusão do fármaco por unidade de área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foram plotadas em relação ao tempo (h) para a cinética de ordem zero. As quantidades cumulativas de difusão de fármaco por unidade de área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foram plotadas contra a raiz quadrada do tempo (\sqrt{h}) para o modelo de Higuchi. O logaritmo das quantidades cumulativas de difusão de fármaco por unidade de área ($\log \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi plotado em relação ao tempo (h) para a cinética de primeira ordem. A raiz quadrada do fármaco não permeado ($\sqrt{\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}}$) foi plotada em relação ao tempo (h) para o modelo de Hixson-Crowell.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram calculados e aqueles cujo valor foi superior a 0,99 foram considerados lineares e assumidos como o modelo capaz de descrever os fenômenos de liberação do fármaco. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir da inclinação da reta obtida por regressão linear. O tempo de latência (T_L , h) calculado representa o tempo necessário para que se atingisse o fluxo em estado estacionário. O coeficiente de permeabilidade (K_p , $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) foi calculado a partir do fluxo de fármaco dividido pela concentração de fármaco aplicada no compartimento doador. A validade dos dados foi confirmada pela avaliação do balanço de massas, em termos de recuperação total dos princípios ativos durante os experimentos.

4.7.2 Estimativa dos fluxos necessários para obter uma resposta farmacológica

Os fluxos alvo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) foram estimados de acordo com Bourdon e colaboradores (2016), a partir da Equação 2:

$$Fluxo\ alvo = \frac{dose\ oral\ diária \times biodisponibilidade_{oral/IV}}{área\ de\ depósito \times (24 - T_L)} \quad (2)$$

na qual: a área de depósito é a área de aplicação do creme (cm²).

4.7.3 Retenção de DNG, GTN, NMS e PRX na mucosa

Após os experimentos de permeação, cada disco de mucosa foi retirado das células para analisar a retenção de fármaco. Os tecidos da mucosa foram cortados em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e colocados em tubos cônicos contendo 10 mL de fase móvel. Os tubos foram deixados em banho de ultrassom por 1 h e as soluções obtidas foram filtradas em membranas de 0,45 µm, transferidas para *vials* cromatográficos e analisadas por CLAE. As concentrações de DNG, GTN, NMS e PRX foram corrigidas para todas as diluições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação dos métodos analíticos

Anteriormente aos ensaios de permeação, os métodos por CLAE foram validados para garantir a qualidade e a confiabilidade dos dados. Os estudos de validação foram realizados utilizando as diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2003) e do INMETRO (2011). Atualmente, foi publicada uma nova resolução RDC n 166 (BRASIL, 2017) sobre a validação analítica no Brasil. Embora esta esteja em vigor, o trabalho foi iniciado antes da publicação da mesma e, portanto, segue a RDC n 899.

Os dados obtidos para as curvas analíticas, bem como os limites de detecção e de quantificação foram apresentados na Tabela 2. O método dos mínimos quadrados obtido no estudo da linearidade apresentou valores dos coeficientes de determinação maiores que 0,99. Os dados foram avaliados através da ANOVA. O teste de significância da regressão gerou valores de $F_{\text{calculado}}$ maiores que $F_{\text{crítico}}$ e o teste da falta de ajuste valores de $F_{\text{calculado}}$ menores que $F_{\text{crítico}}$. Portanto, pode-se afirmar, com 95 % de confiança, que existe uma relação linear entre as variáveis e que não existe falta de ajuste no modelo para a faixa de concentração estudada.

Os LD e LQ forneceram a comprovação de que os intervalos de concentrações de trabalho escolhidos foram capazes de detectar e quantificar os princípios ativos com precisão e exatidão aceitáveis.

Tabela 2. Resultados obtidos para a linearidade, LD e LQ.

<i>Princípio Ativo</i>	<i>Curva analítica</i>	<i>Linearidade</i>				
		R^2	F_{cal} Regressão	F_{cal} Falta de ajuste	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
DNG ^a	$y = 1245,58x - 35,68$	0,9971	4512,40	1,17	0,35	1,16
GTN ^b	$y = 41,59x + 459,85$	0,9963	3585,18	1,87	12,12	40,40
NMS ^c	$y = 19,18x + 5,74$	0,9972	4676,69	0,75	0,45	1,50
PRX ^d	$y = 43,69x + 25,71$	0,9922	1657,52	1,46	3,62	12,05

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação; CV: coeficiente de variação.

Intervalo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$): ^a(7,00 – 13,00), ^b(71,12 – 132,08), ^c(14,42 – 26,78), ^d(14,42 – 26,78).

Limites de especificação: $R^2 > 0,99$; ANOVA: $F_{\text{crítico}}$ da regressão $\gg 4,67$; $F_{\text{crítico}}$ da falta de ajuste $< 3,71$.

Os dados obtidos para a especificidade, precisão e exatidão foram apresentados na Tabela 3. Os resultados da especificidade foram determinados pelo cálculo da porcentagem de discrepância. Todos os analitos apresentaram porcentagem de discrepância com valores inferior a 2 %. Dessa forma, não houve diferença significativa entre a quantificação do ativo no padrão e na formulação.

O ensaio de precisão foi avaliado através da repetibilidade e da precisão intermediária. Todos os coeficientes de variação obtidos estão dentro do limite preconizado pela legislação ($\leq 5\%$). Isso comprovou a capacidade dos métodos de proporcionar resultados próximos para uma série de medidas de uma mesma amostra, nas mesmas condições experimentais (repetibilidade) e, sujeito a variações de analista e dia (precisão intermediária).

A exatidão foi avaliada, para ambos os métodos, por meio do teste de recuperação. A taxa de recuperação média obtida encontrou-se dentro da especificação (entre 98 e 102 %). Esse resultado demonstra a capacidade do método de fornecer resultados próximos ao valor verdadeiro.

Tabela 3. Resultados obtidos para a especificidade, precisão e exatidão.

<i>Princípio</i> <i>Ativo</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Precisão</i>		<i>Exatidão</i>
	Discrepância (%)	Repetibilidade (CV, %)	Precisão intermediária (CV, %)	Recuperação (%)
DNG	0,48	0,82	1,28	100,24
GTN	1,32	0,83	1,79	99,59
NMS	0,99	0,50	1,06	99,63
PRX	1,52	0,55	1,61	100,61

CV: coeficiente de variação.

Limites de especificação: discrepância < 2 %; repetibilidade e precisão intermediária < 5 % e recuperação = 100 % \pm 2 %.

Diante do estudo dos parâmetros de validação analítica, podemos dizer que os mesmos atenderam aos respectivos critérios de aceitação.

5.2 Estudo da solubilidade de DNG, GTN, NMS e PRX em meio receptor Hank's

Os ensaios de permeação foram conduzidos de forma a utilizar a solução Hank's, um dos meios receptores de escolha para os estudos com tecido vaginal

(CARDOZO, 2013). Primeiramente, a solubilidade dos fármacos na solução Hank's foi determinada para confirmar que o meio não prejudicaria o processo de difusão. NMS e PRX apresentaram solubilidades ($226,78$ e $266,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) maiores do que DNG ($39,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e GTN ($131,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Entretanto, nenhuma concentração excessiva do fármaco atingiu o meio receptor durante os experimentos de permeação. A solução de Hank's foi então considerada um meio apropriado para a permeação vaginal, sendo utilizada para os ensaios de permeação.

5.3 Estudo de permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX

A endometriose é uma condição inflamatória causada pela produção desregulada de estrogênio no tecido endometriótico ectópico e nas lesões endometrióticas. Esta reação inflamatória crônica resulta no aparecimento da dor pélvica, sintoma que afeta a qualidade de vida das mulheres (BULUN et al., 2015; FACCHIN et al., 2015; CULLEY et al., 2013). O seu tratamento farmacológico é baseado no uso de substâncias esteroidais que diminuam a dominância estrogênica como o DNG e a GTN e AINEs para reduzir a inflamação, como a NMS e o PRX.

Apesar de todos esses medicamentos estarem disponíveis e serem predominantemente recomendados por via oral, esta pode ser uma forma não conveniente de administração para uma ampla gama de pacientes (BOURDON et al., 2016). Dentro deste contexto, a administração desses fármacos na mucosa vaginal pode ser promissora para o tratamento da DPAE.

Um estudo clínico de Maia e colaboradores (2015) avaliou o uso do creme vaginal de GTN em associação com o uso oral do extrato de *Pinus pinaster* e resveratrol e comprovou a eficácia dessa associação no tratamento da DPAE. Este trabalho estimula a investigação de formulações intravaginais comerciais contendo este princípio ativo.

O desenvolvimento de veículos semissólidos é demorado devido a diversos parâmetros que podem afetar a permeabilidade do fármaco através da membrana mucosa (MAIA et al., 2015). Dessa forma, torna-se viável a utilização de excipientes disponíveis no mercado. Neste contexto, o Pentravan® (Fagron, Brasil) foi utilizado para a incorporar os PAs em estudo. Trata-se de uma emulsão óleo em água com

tecnologia lipossomal que possui vantagens como estabilidade física e maior capacidade para carregamento de fármacos (KIRILOV et al., 2016).

Durante o preparo da formulação, a dosagem de DNG (0,2 %, m/m) e GTN (0,5 %, m/m) foi escolhida baseando-se em doses previamente recomendadas pelo produtor da base Pentravan[®] (Fagron, Brasil). A concentração de GTN também foi baseada na escolha realizada para a formulação no estudo clínico de Maia e colaboradores (2015). Enquanto isso, a dosagem de NMS e PRX (0,2 %, m/m) foi escolhida baseando-se nas doses orais diárias recomendadas para os mesmos.

Os fármacos avaliados apresentam baixo peso molecular, com valores próximos (DNG = 311,425 g.mol⁻¹, GTN = 308,421 g.mol⁻¹, NMS = 308,308 g.mol⁻¹ e PRX = 331,346 g.mol⁻¹). Além disso, ambos apresentam um coeficiente de partição que os caracteriza com boa lipofilicidade (DNG = 3,37, GTN = 3,39, NMS = 2,6 e PRX = 2,2). Essas propriedades os tornam candidatos para que sejam absorvidos através da mucosa vaginal. Dessa forma, ensaios de permeação em mucosa vaginal suína foram realizados para os mesmos, durante um período de 24 h.

Nos experimentos, todos os princípios ativos foram quantificados no meio receptor. As concentrações máximas dos fármacos dentro do meio receptor, durante os ensaios de permeação, foram consideravelmente menores do que as suas solubilidades máximas: 8,48 µg.mL⁻¹ para DNG (4,6 vezes menor), 14,47 µg.mL⁻¹ para GTN (9 vezes menor), 1,26 µg.mL⁻¹ para NMS (180 vezes menor) e 17,24 µg.mL⁻¹ para PRX (15 vezes menor). Isso permitiu que os parâmetros cinéticos envolvidos na liberação de GTN, DNG, NMS e PRX fossem estudados a partir do veículo utilizado.

Na Tabela 4 foram apresentadas as equações geradas pela regressão e os valores dos coeficientes de determinação obtidos para quatro modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell). Os coeficientes de determinação cujo valor foi superior a 0,99 foram considerados lineares e assumidos como o modelo capaz de descrever os fenômenos de liberação do fármaco. Dessa forma, a ordem zero apresentou-se como a mais adequada para GTN e PRX, sugerindo que o processo de absorção dos mesmos não dependeria da concentração do fármaco e que, a quantidade de fármaco permeado, estaria diretamente relacionada ao tempo do teste. Em contrapartida, o modelo de Higuchi foi selecionado para descrever os perfis cinéticos de DNG e NMS, sugerindo que a liberação destes é diretamente proporcional à raiz quadrada do tempo.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX na base Pentravan®.

<i>Fármaco</i>	<i>Modelo Matemático</i>	<i>Equação</i>	R^2	J_s ($\mu\text{g.cm}^{-2}\text{h}^{-1}$)	T_L (h)	K_p (cm.h^{-1}) [*]
DNG	<i>Ordem zero</i>	$y = 3,03x + 12,98$	0,9283			
	<i>Higuchi</i>	$y = 15,98x - 4,14$	0,9895	15,98	0,26	0,21
	<i>Primeira ordem</i>	$y = 0,04x + 1,16$	0,7767			
	<i>Hixson-Crowell</i>	$y = -0,11x - 2,42$	0,8368			
GTN	<i>Ordem zero</i>	$y = 3,72x + 1,32$	0,9957	3,72	0,35	0,02
	<i>Higuchi</i>	$y = 22,09x - 23,99$	0,9842			
	<i>Primeira ordem</i>	$y = 0,05x + 0,82$	0,8289			
	<i>Hixson-Crowell</i>	$y = -0,17x + 4,88$	0,9020			
NMS	<i>Ordem zero</i>	$y = 0,37x + 0,12$	0,9511			
	<i>Higuchi</i>	$y = 2,26x - 2,55$	0,9970	2,26	1,28	0,01
	<i>Primeira ordem</i>	$y = 0,04x + 0,08$	0,8587			
	<i>Hixson-Crowell</i>	$y = -0,08x + 2,22$	0,9494			
PRX	<i>Ordem zero</i>	$y = 3,91x - 0,71$	0,9921	3,91	0,29	0,003
	<i>Higuchi</i>	$y = 22,90x - 26,47$	0,9538			
	<i>Primeira ordem</i>	$y = 0,05x + 0,81$	0,8762			
	<i>Hixson-Crowell</i>	$y = -1,18x + 5,06$	0,8473			

J_s : Fluxo em estado estacionário. T_L : tempo de latência. K_p : coeficiente de permeabilidade. Resultados expressos como média de 6 replicatas.

Os perfis médios obtidos para os fármacos (Figura 9), relacionaram a quantidade cumulativa e o tempo (modelo de ordem zero). Como esperado, a quantidade permeada de NMS e PRX respondeu ao aumento do tempo e mostrou um perfil mais linear que os demais cujo modelo foi representado por Higuchi.

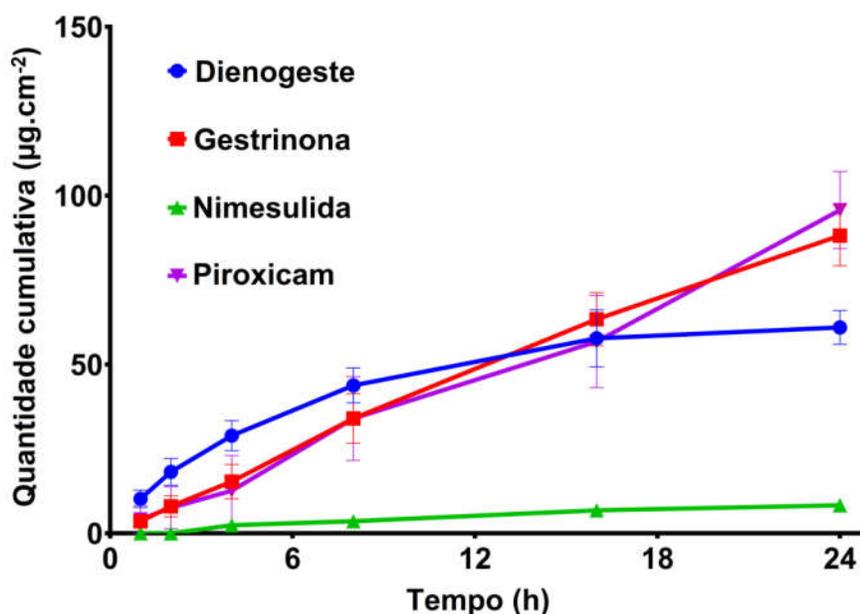


Figura 9. Perfis médios de permeação ($n = 6$) de DNG, GTN, NMS e PRX em veículo Pentravan[®], investigados em mucosa vaginal suína. Os dados experimentais são apresentados com símbolos e ajustes por linhas simples.

O fluxo em estado estacionário foi determinado a partir da inclinação da reta e o melhor fluxo médio foi alcançado com a formulação de DNG ($15,98 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), seguido de PRX ($3,91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), GTN ($3,72 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) e NMS ($2,26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). O coeficiente de permeabilidade (K_P , $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) foi calculado a partir do fluxo de fármaco dividido pela concentração de fármaco aplicada no compartimento doador. DNG ($0,21 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) e GTN ($0,02 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) apresentaram valores maiores que NMS ($0,01 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) e PRX ($0,03 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$).

O fluxo é diretamente proporcional ao coeficiente de permeabilidade e à concentração do penetrante no veículo. Dessa forma, os fármacos que apresentam um fluxo maior, apresentaram melhor solubilidade no veículo utilizado (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2015).

Entretanto, o fluxo em estado estacionário nem sempre se correlaciona diretamente com uma resposta farmacológica. Dessa forma, a comparação entre os fluxos obtidos experimentalmente e o fluxo alvo necessário para obter um efeito terapêutico pode ser realizada para estimar o potencial clínico das formulações testadas (BOURDON et al., 2016). A comparação entre o fluxo obtido nos experimentos e o fluxo alvo calculado e os valores dos parâmetros utilizados para o cálculo foram demonstrados na Tabela 5.

Podemos observar que os fluxos obtidos experimentalmente para DNG e GTN foram maiores que o fluxo alvo necessário para obter o efeito clínico, entretanto, os fluxos obtidos para NMS e PRX não se mostraram compatíveis com o fluxo alvo. Estes dados sugerem que apenas o fluxo obtido nos experimentos para DNG e GTN podem ser capazes de gerar um efeito terapêutico.

Tabela 5. Comparação entre o fluxo obtido experimentalmente e o fluxo alvo calculado.

Fármaco	J_s ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Fluxo alvo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Biodisponi- bilidade oral	Dose oral diária recomendada (mg)
DNG	15,98	0,87	0,9	2
GTN	3,72	0,69	1,0	1,4
NMS	2,26	70,45	0,7	20
PRX	3,91	9,64	1,0	20

Área de depósito (área superficial da vagina humana) de $87,46\text{ cm}^2$, conforme determinado por Pendergrass, Beloviez e Reeves (2003).

O cálculo do balanço de massas do estudo (Tabela 6) apresentou valores de recuperação média com valores satisfatórios e dentro dos critérios de aceitação para os ensaios de permeação (entre 85 % e 115 %) (FDA, 2015). Dessa forma, todo o fármaco aplicado foi quantificado, sem que houvesse perda durante o processo.

A porcentagem passível de permear foi calculada através da relação entre a quantidade de fármaco presente no meio receptor e a quantidade de PA efetivamente aplicada à célula doadora. A análise do balanço de massas nos permitiu observar porcentagens de permeação por dose de 83,31 %, 70,48 %, 1,67 % e 17,65 % para DNG, GTN, NMS e PRX, respectivamente. Este resultado corroborou com a análise do fluxo em estado estacionário encontrado e sugeriu que, na matriz estudada, DNG e GTN foram os melhores candidatos à permeação vaginal. Possivelmente, as concentrações alcançadas de DNG e GTN possam ser suficientes para que estes atuem de forma sistêmica. Entretanto, ensaios *in vivo* são necessários para avaliar a sua biodisponibilidade e comprovar o seu efeito clínico.

Tabela 6. Balanço de massas do ensaio de permeação vaginal de DNG, GTN, NMS e PRX na base Pentravan®.

Parâmetros	DNG	GTN	NMS	PRX
	0,2%	0,5%	2%	2%
	(m/m)	(m/m)	(m/m)	(m/m)
Quantidade teórica de princípio ativo (PA) aplicada na mucosa (µg) ^a	140	350	1400	1400
Quantidade de PA retida no bastão de espalhamento (µg)	10,69	117,34	472,63	388,83
Quantidade real de PA aplicada na mucosa (µg) ^b	129,31	232,66	927,37	1011,17
Quantidade de PA total permeada após 24h (µg) ^c	107,47	164,00	15,51	178,52
Quantidade de PA retida na mucosa (µg)	4,08	50,77	808,65	651,53
Porcentagem de permeação (%) ^d	83,11	70,48	1,67	17,65
Total de recuperação (%) ^e	87,31	94,89	92,63	87,03

^a Quantidade total de PA presente na formulação aplicada no compartimento doador.

^b Quantidade teórica total (a) menos a quantidade retida no bastão de espalhamento.

^c Quantidade de PA no meio receptor.

^d Estimativa matemática do total de PA que poderia permeiar a pele de acordo com a quantidade aplicada $[(c/b) \times 100]$

^e Razão entre PA quantificado no bastão de espalhamento, na mucosa e no meio receptor pela quantidade total aplicada (a).

PA: princípio ativo.

A NMS e o PRX não apresentaram porcentagens de permeação tão expressivas quanto DNG e GTN. Entretanto, esse resultado não impede que a formulação contendo os AINES seja utilizada para obter um tratamento local. Embora os ingredientes ativos possam se apresentar em níveis sanguíneos sistêmicos baixos, a concentração dos mesmos na região pélvica permite com que alcancem altos níveis teciduais (MAIA et al., 2015). A modificação da formulação deve ser realizada para que a NMS e o PRX sejam utilizados de forma sistêmica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados descritos sugerem que a matriz estudada proporcionou uma boa taxa de permeação para DNG e GTN. Estes fármacos apresentaram um fluxo através do tecido vaginal maior do que o fluxo alvo necessário para os efeitos farmacológicos. Entretanto, a possibilidade do seu efeito terapêutico deve ser comprovada por estudos *in vivo*. NMS e PRX obtiveram baixas taxas de permeação e não atingiram o fluxo alvo, demonstrando a possibilidade de uso para um efeito no tecido local. Contudo, para o uso terapêutico sistêmico de NMS e PRX, estudos adicionais devem ser realizados, com a possível modificação da formulação.

REFERÊNCIAS

AEFI. Asociación Española de Farmaceuticos de la Industria. **Validación de Métodos Analíticos**. Barcelona: AEFI, 2001. 315p. Disponível em: <https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria>. Acesso em: 14 out. 2018.

ALMEIDA, P. A. **Taxifolina: quantificação do flavonoide no extrato seco da casca de *Pinus pinaster* e avaliação da liberação *in vitro* e permeação vaginal *ex vivo***. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

ALVES, M. C.; ALMEIDA, P. A.; POLONINI, H. C.; BHERING, C. A. P.; OLIVEIRA, F. A.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. Taxifolin: avaluation through *ex vivo* permeations on human skin and porcine vaginal mucosa. **Current Drug Delivery**, Beijing, v. 15, n. 8, p. 1123-1134, 2018.

ANWAR, M.R.; CAMARDA, K.V.; KIEWEG, S.L. Mathematical model of microbicidal flow dynamics and optimization of rheological properties for intra-vaginal drug delivery: role of tissue mechanics and fluid rheology. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, New York, v. 48, n. 9, p. 1625-1630, 2015.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BELLELIS, P.; PODGAEC, S.; ABRAO, M. S. Environmental factors and endometriosis: a point of view. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia: revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 10, p. 433-435, 2014.

BOURDON, F.; LECOEUR, M.; LCONTE, L.; ULTRÉ, V.; KOUACH, M.; ODOU, P. VACCHER, C.; FOULON, C. Evaluation of Pentravan[®], Pentravan[®] Plus, Phytobase[®], Lipovan[®] and Pluronic Lecithin Organogel for the transdermal administration of antiemetic drugs to treat chemotherapy-induced náusea and vomiting at the hospital. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 774-787, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 26 out. 2017.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 17 abril 2012.

_____, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de Medicamentos de referência**, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12 ago. 2018.

BROWN, J.; CRAWFORD, T. J.; ALLEN, C.; HOPEWELL, S.; PRENTICE, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 1-21, 2017.

BRUN, E. M. HERNANDEZ-ALBORS, A.; VENTURA, R.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Enzyme-linked immunosorbent assays for the synthetic steroid gestrinone. **Talanta**, London, v.82, n. 4, p. 1581-1587, 2010.

BULLETTI, C.; COCCIA, M. E.; BATTISTONI, S.; BORINI, A. Endometriosis and infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [S.l.], v. 27, n. 8, p. 441-447, 2010.

BULUN, S. E.; MONSIVAIS, D.; KAKINUMA, T.; FURUKAWA, Y.; BERNARDI, L.; PAVONE, M. E. Molecular biology of endometriosis: from aromatase to genomic abnormalities. **Seminars in Reproductive Medicine**, [S.l.], v. 33, n. 3, p. 220-224, 2015.

CARDOSO, C. A. O. **Estudo da permeação vaginal de Clotrimazol pelo método de *Ussing chambers***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

CARAMELLA, C. M.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; SANDRI, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 92, n. 1, p. 39-52, 2015.

CARVALHO, M. J.; BARBOSA, A. COUTO, D.; GERALDES, F.; VILHENA, I.; REIS, J. L.; DAMASCENO, J.; FIGUEIREDO, S.; ÁGUAS, F. **Endometriose – recomendações de consenso nacionais – tratamento médico**. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**, Porto, v. 10, n. 3, p. 257-267, 2016.

CHOU DHURY, S. DAS, M. KAR, A review on novelty and potentiality of vaginal drug delivery. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, Washington, v. 3, n. 2, p. 1033-1044, 2011.

COUTINHO, E. M.; AZADIAN-BOULANGER, G. Treatment of endometriosis by vaginal administration of gestrinone. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 47, n. 3, p. 418-422, 1988.

CULLEY, L.; LAW, C.; HUDSON, N.; DENNY, E.; MITCHELL, H.; BAUM GARTEN, M.; RAINE-FENNING, N. The social and psychological impact of endometriosis on women's lives: a critical narrative review. **Human Reproduction Update**, Grimbergen, v. 19, n. 6, p. 625-639, 2013.

CUNHA, H. P. **Avaliação da eficácia farmacológica da fluoxetina e da nimesulida coadministradas com *Panax ginseng* em ratos Wistar.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

DARDES, R. C. M.; MORAES, A. S.; SANTOS, M. B. Como diagnosticar e tratar dismenorréia. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 68, n. 12, p. 14-18, 2011.

DOBARIA, N.; MASHRU, R.; VADIA, N. H. Vaginal drug delivery systems: A Review of Current Status. **East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 3-13, 2007.

DRAGICEVIC, N. I.; MAIBACH, H. **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration.** 1. ed. Heidelberg: Springer, 2015. 341 p.

DUNSELMAN, G. A.; VERMEULEN, N.; BECKER, C.; CALHAZ-JORGE, C.; D'HOOGHE, T.; DE BIE, B. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. **Human Reproduction**, Grimbergen, v. 29, n. 3, p. 400-412, 2014.

FAUNDES, A.; BRACHE, V.; ALVAREZ, F. Pros and cons of vaginal rings for contraceptive hormone delivery. **American Journal of Drug Delivery**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 241-250, 2004.

FACCHIN, F.; BARBARA, G.; SAITA, E.; MOSCONI, P.; ROBERTO, A.; FEDELE, L. Impacto f endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. **Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology**, [S.l.], v. 36, n. 4, p. 135-141, 2015.

FACCHIN, F.; BARBARA, G.; SAITA, E.; ERZEGOVESI, S.; MARTONI, R. M.; VERCELLINI, P. Personality in women with endometriosis: temperament and character dimensions and pelvic pain. **Human Reproduction**, Grimbergen, v. 31, n. 7, p. 1515-1521, 2016.

FARLAND, L. V.; SHAH, D. K.; KVASKOFF, M. K.; ZONDERVAN, K. T.; MISSMER, S. A. Epidemiological and clinical risk factors for endometriosis. **Biomarkers for Endometriosis**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 34-41, 2017.

FDA. Food and Drug Administration. **Piroxicam official information, side effects and uses.** New Hampshire: FDA, 2018, 23 p. Disponível em: <<http://www.drugs.com/pro/piroxicam.html>>. Acesso em: 12 ago. 2018.

FDA. Food and Drug Administration. **Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry.** New Hampshire: FDA, 2015, 17 p. Disponível em: <https://www.fip.org/files/fip/BPS/BCS/Biowaiver_guidance_revision_2015.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2018.

GAJBHIYE, R.; MCKINNON, B.; MORTLOCK, S.; MUELLER, M.; MONTGOMERY, G. Genetic variation at chromosome 2q13 and its potential influence on endometriosis susceptibility through effects on the IL-1 family. **Reproductive Sciences**, New Haven, v. 25, n. 9, p. 1307-1317, 2018.

GIGLIO, M. R. P.; MELO, G. P.; FERREIRA, V. G.; ALBERNAZ, M. A.; RIBEIRO, M. O. Conhecimentos dos médicos residentes de ginecologia e obstetrícia sobre contracepção hormonal em situações especiais. **Revista Brasileira de Educação Médica**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 69-78, 2017.

GIUDICE L, C. Clinical practice. **Endometriosis**, [S.l.], v. 362, n. 25, p. 2389-2398, 2010.

GIULIANI, M.; COSMI, V.; PIERLEONI, L.; RECINEA, A.; PIERONI, M.; TICINO, A.; PORPORA, M. G.; SIMONELLI, C. Quality of life and sexual satisfaction in women suffering from endometriosis: An Italian preliminary study. **Sexologies**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. e-12-e-19, 2015.

GONÇALVES, M. J. F. **Estado de depressão, ansiedade e qualidade de vida de mulheres com endometriose e dor pélvica crônica**. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade de Porto, Porto, 2016.

HUERTA, C.; ABERTURAS, M. D. R.; MOLPECERES, J. Nimesulide-loaded nanoparticles for the coadjuvant treatment of prostate cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 493, n. 1-2, p. 152-160, 2015.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 301-313, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ-CGCRE-008**. Brasília: INMETRO, 2011. 20 p.

JUG, M.; HAFNER, A.; LOVRIC, J.; KREGAR, M. L.; PEPIC, I.; VANIC, Z.; CETINACIZMEK, B.; FILIPOVIC-GRCIC, J. An overview of *in vitro* dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 350-366, 2018.

KAPPOU, D.; MATALLIOTAKIS, M.; MATALLIOTAKIS, I. Medical treatments for endometriosis. **Minerva Ginecologica**, Torino, v. 62, n. 5, p. 415-432, 2010.

KIRILOV, P.; TRAN, V. H.; DUCROTTÉ-TASSEL, A.; SALVIA, J. P.; PERROT, S.; HAFTEK, M.; BOULIEU, R.; PIROT, F. Ex-Vivo percutaneous absorption of enrofloxacin: Comparison of LMOG organogel vs. Pentravan®cream. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 498, n. 1-2, p. 170–177, 2016.

KATZ, D. F.; YUAN, A.; GAO, Y. Vaginal drug distribution modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 2-13, 2015.

KULKARNI, A.D.; BARI, D.B.; SURANA, S. J.; PARDESHI, C. V. In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 108-117, 2016.

MACHADO, R. M.; OLIVEIRA, A. P.; GASPAR, C.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, R. P. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 92, n. 1, p. 14-26, 2015.

MAIA, J. R.; HADDAD, C.; CASOY, J. The effect of a combination of vaginal danazol with pycnogenol on pelvic pain in patients with deep endometriosis using Mirena. **The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. S91-S240, 2014.

MAIA, H.; HADDAD, C.; DOS SANTOS JUNIOR, W. S. D.; PINHEIRO, N. SANTOS, A. S.; COUTINHO, A. Clinical Experience with Vaginal Gestrinone in Pentravan[®] in the Treatment of Endometriosis Pain. **Austin Journal of Reproductive Medicine and Infertility**, New Jersey, v. 2, n. 4, p. 1021, 2015.

MARTINEZ, B.; CANSEER, E.; GREDILLA, E.; ALONSO, E.; GILSANZ, F. Management of Patients with Chronic Pelvic Pain Associated with Endometriosis Refractory to Conventional Treatment. **Pain Practice**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 53-58, 2013.

MCCORMACK, P. L. Dienogest: a review of its use in the treatment of endometriosis. **Drugs**, [S.l.], v. 70, n. 15, p. 2073–2088, 2010.

MORI, T.; ITO, F.; MATSUSHIMA, H.; TAKAOKA, O.; TANAKA, Y.; KOSHIBA, A.; KUSUKI, I.; KITAWAKI, J. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist B-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 5, p. 1228-1235, 2015.

MOYSÉS, D. A. **Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico do piroxicam em linhagem vero**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular – Universidade Federal do Paraná, Belém, 2016.

NEVES, J. das; BAHIA, M.F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 318, n. 1-2, p. 1-14, 2006.

OLEJNIK, A.; GOSCIANSKA, J.; NOWAK, I. Active Compounds Release from Semisolid Dosage Forms, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 101, n. 11, p. 4032-4045, 2012.

OLIVEIRA, R. P.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. M. New Strategies for local treatment of vaginal infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 92, n. 1, p. 105-122, 2015.

PARASAR, P.; OZCAN, P.; TERRY, K. L. Endometriosis: epidemiology, diagnosis and clinical management. **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 34-41, 2017.

PAVONE, M. E.; LYTTLE, B. M. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks and challenges faced. **International Journal of Women's Health**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 663-672, 2015.

PENDERGRASS, P. B.; BELOVICZ, M. W.; REEVES, C. A. Surface area of the human vagina as measured from vinyl polysiloxane casts. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, v. 55, n. 2, p. 110-113, 2003.

PEREIRA, S. V. **Obtenção de dispersões sólidas microparticuladas de piroxicam por spray congealing**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PEREIRA, R. R. A.; BRUSCHI, M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 38, n. 6, p. 643-652, 2012.

PETRAGLIA, F.; HORNING, D.; SEITZ, C.; FAUSTMANN, T.; GERLINGER, C.; LUISI, S.; LAZZERI, L.; STROWITZKI, T. Reduced pelvic pain in women with endometriosis: efficacy of long-term dienogest treatment. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [S.l.], v. 285, n. 1, p. 167-173, 2012.

PINTO, J. P. L. **Dienogeste no tratamento a longo prazo para endometriose profunda: avaliação clínica, ultrassonográfica e de qualidade de vida**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

POLONINI, H.C.; SOLDATI, P.P.; OLIVEIRA, M.A.L. de; BRANDÃO, M.A.F.; CHAVES, M. das G.M.; RAPOSO, N.R.B. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 720-727, 2014.

POLONINI, H. C.; SOLDATI, P. P.; ALMEIDA, P. A.; DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H.; DE OLIVEIRA, M. A. L.; BRANDÃO, M. A. F. Permeation profiles of resveratrol cream delivered through porcine vaginal mucosa: Evaluation of different HPLC stationary phases. **Journal of Chromatography B**, [S.l.], v. 1002, n. 1, p. 8-12, 2015.

POLONINI, H.; LOURES, S.; ALVES, M. C.; FERREIRA, A. O.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. Feasibility Study Evaluating Pentravan® for the Intravaginal Administration of Active Pharmaceutical Ingredients to Reduce Pelvic Pain Related to Endometriosis. **Drug Delivery Letters**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 200-208, 2018.

POPE, C. J.; SHARMA, V.; SHARMA, S.; MAZMANIAN, D. A systematic review of the association between psychiatric disturbances and endometriosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, [S.l.], v. 37, n. 11, p. 1006-1015, 2015.

RUHLAND, B.; AGIC, A.; KRAMPE, J.; DIEDRICH, K.; HORNUNG, D. Innovations in conservative endometriosis treatment: Na updated review. **Minerva Ginecologica**, Torino, v. 63, n. 3, p. 247-249, 2011.

SANTOS, H. C. O.; TACON, K. C. B.; CUNHA, L. C. C.; CASTRO, E. C.; AMARAL, W. N. Efeito analgésico do piroxicam para tratamento de dor aguda induzida. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 117-120, 2011.

SARMENTO, F.; ANDRADE, F.; SILVA, S. B.; RODRIGUES, F.; DAS NEVES, J.; FERREIRA, D. Cell based in vitro models for predicting drug permeability. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 607–621, 2012.

SCHRAGER, S.; FALLERONI, J.; EDGOOSE, J. Evaluation and treatment of endometriosis. **American Family Physician**, Kansas, v. 87, n. 2, p. 107-113, 2013.

SOARES, S. R.; MARÍNEZ-VAREA, A.; HIDALGO-MORA, J. J.; PELLICER, A. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. **Fertility and Sterility**, New York, v. 98, n. 3, p. 529-555, 2012.

SOURIAL, S.; TEMPEST, N.; HAPANGAMA, D. K. Theories on the pathogenesis of endometriosis. **International Journal of Reproductive Medicine**, Cairo, v. 2014, n. 1, p. 1-9, 2014.

SQUIER, C. A.; MANTZ, M. J.; SCHLIEVERT, P. M.; DAVIS, C. C. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 9-21, 2008.

SRIKRISHNA, S.; CARDOZO, L. The vagina as a route for drug delivery: a review. **International Urogynecology Journal**, London, v. 24, n. 4, p. 537-543, 2013.

SUGIMOTO, K.; NAGATA, C.; HAYASHI, H.; YANAGIDA, S.; OKAMOTO, A. Use of dienogest over 53 weeks for the treatment of endometriosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Malden, v. 41, n. 12, p. 1921-1926, 2015.

TONSA, S. **Endometriose, doença que muitas mulheres têm, mais não sabem**. Disponível em: <<http://psicologiaautoestimaebeleza.blogspot.com/2013/12/endometriose-doenca-que-muitas-mulheres.html>>. Acesso em: 05 ago. 2018.

VANIĆ, Ž.; ŠKALKO-BASNET, N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 29-41, 2013.

VERCELLINI, P.; VIGANO, P.; SOMIGLIANA, E.; FEDELE, L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, Milan, v. 10, n. 5, p. 261-275, 2014.

ANEXO A

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Drug Delivery Letters, 2018, 8, 000-000

1

REVIEW ARTICLE

Feasibility Study Evaluating Pentravan[®] for the Intravaginal Administration of Active Pharmaceutical Ingredients to Reduce Pelvic Pain Related to Endometriosis

Hudson Polonini^{1,2,*}, Sharlene Loures¹, Michele C. Alves³, Anderson O. Ferreira^{1,3}, Marcos Antônio F. Brandão^{1,3} and Nádia R. B. Raposo³

¹Ortofarma – Quality Control Laboratory, Matias Barbosa – MG, Brazil; ²Suprema – Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, Brazil; ³NUPICS – Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora – MG, Brazil

Abstract: *Introduction:* Intravaginal delivery is currently considered to be an important alternative route for poorly-absorbed, rapidly metabolised oral drugs.

Objectives: The objective of this study was to evaluate (i) the preliminary feasibility of using the ready-to-use vehicle Pentravan[®] to compound dienogest, gestrinone, nimesulide and piroxicam and (ii) the vaginal administration of these formulations to patients with pelvic pain associated with endometriosis (PPRE).

Methods: Intravaginal creams were compounded containing the active pharmaceutical ingredients (APIs) individually and with no addition of permeation enhancers (dienogest 0,2%, gestrinone 0,5%, nimesulide 2,0% and piroxicam 2,0%). For quality control, pH, drug content and particle size were determined. HPLC methods were developed and validated for each formulation. Vaginal permeation profiles were determined using porcine vaginal mucosa on Franz-type diffusion cells and then kinetics parameters were determined.

Results: Quality control of the formulations showed that the products were convenient and easily prepared, with narrow size distribution. Diffusion experiments demonstrated fluxes of $15.98 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for dienogest, $3.91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for piroxicam, $3.72 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for gestrinone and $2.26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for nimesulide. Dienogest and gestrinone had permeation fluxes and quantities of drug absorbed hypothetically compatible with therapeutic effect *in vivo* (fluxes to attempt in order to deliver the recommended daily doses to treat PPRE were calculated as $0.87 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for dienogest, $0.69 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for gestrinone, $70.45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for nimesulide and $9.64 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for piroxicam), whereas nimesulide and piroxicam studies showed a great amount of these drugs retained in the vaginal mucosa. This could account for a local effect for these two substances.

Conclusion: Pentravan[®], which already has an established role for transdermal delivery of drugs, seems to be a feasible intravaginal vehicle. Particularly in this study, we highlight its use for vaginal delivery of dienogest and gestrinone for the treatment of PPRE. *In vivo* studies must now be conducted to confirm these data.

Keywords: Vaginal delivery, Permeation kinetics, Pentravan, Franz-type diffusion cell, Dienogest, Gestrinone, Nimesulide, Piroxicam.

1. INTRODUCTION

Endometriosis is an inflammatory condition caused by the deregulated production of estrogens in both the eutopic

endometrium and in the endometriotic lesions. The stimulation of local estrogen synthesis will maintain and enlarge the inflammatory milieu and lead to an overproduction of local prostaglandins [1]. Pelvic pain related to endometriosis (PPRE) affects nearly 80% of women with endometriosis [2]. Researchers have shown that women who suffer from endometriosis associated with pelvic pain can have greater psychological disruption and poorer mental health and quali-

*Address correspondence to this author at Ortofarma – Quality Control Laboratory, BR 040, Km 800, Empresarial Park Sul, 39, Matias Barbosa, MG, 36120-000, Brazil; Tel/Fax: +55 32 3273 3560; E-mail: hudson@ortofarma.com.br

ANEXO B

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 021/2014 – CEUA sobre “Desenvolvimento de formulações farmacêuticas transdérmicas inovadoras contendo princípios ativos naturais e/ou sintéticos” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO com a colaboração de NÁDIA RESENDE BARBOSA RAPOSO e PRISCILA APARECIDA DE ALMEIDA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/06/2014. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizadas 3 porcas de 4 meses de idade (*Sus domesticus*) conforme solicitado e que serão utilizados no período de 22/08/2014 a 22/08/2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 021/2014 - CEUA about “Desenvolvimento de formulações farmacêuticas transdérmicas inovadoras contendo princípios ativos naturais e/ou sintéticos” under responsibility of MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO and collaboration of NÁDIA RESENDE BARBOSA RAPOSO and PRISCILA APARECIDA DE ALMEIDA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/06/2014. For the development of this research 3 female pigs of 4-months-old, will be delivered as requested in the period of 22/08/2014 to 22/08/2015.

Juiz de Fora, 06 de junho de 2014

Presidente
CEUA

Vice-presidente
CEUA

CONCLUSÃO GERAL

Os dois capítulos descritos na presente tese demonstram que a administração de fármacos na pele e na mucosa vaginal pode ser avaliada como uma forma alternativa à tradicional via oral. Embora o trabalho não permita afirmar que essas vias alternativas aumentem a eficácia farmacológica dos fármacos avaliados, existe uma premissa de que essas vias possam oferecer vantagens em relação à via oral. Dentro dessas vantagens encontram-se a redução de efeitos adversos, a ausência de interação com alimentos, bebidas e outros fármacos, o uso de dosagens menos freqüentes, entre outros. Nesse sentido, a inserção de TAX, DNG, GTN, NMS e PRX em forma farmacêutica semissólida demonstrou uma alternativa farmacotécnica simples e interessante para que os mesmos fossem avaliados com relação à sua permeação nas respectivas vias. Dentro desse contexto, as ferramentas analíticas utilizadas para as análises de quantificação e de permeação foram consideradas satisfatórias para o proposto. Os resultados obtidos para TAX, DNG e GTN demonstraram que os mesmos possuem boa permeação dentro da via avaliada para cada fármaco. Entretanto, o efeito terapêutico sistêmico dos mesmos deve ser comprovado por ensaios *in vivo*. Os resultados obtidos para PRX e NMS sugerem que as concentrações obtidas dos mesmos não são ideais para a ação sistêmica e apenas para atuarem no tecido local. Contudo, novas estratégias farmacotécnicas seriam necessárias para melhorar a permeação destes fármacos.
